

BAB 1: PENGENALAN KAJIAN

1.1 Latar Belakang Kajian.

Makanan adalah sumber tenaga manusia. Allah (s.w.t.) memerintahkan manusia makan bukan sahaja makanan yang halal tetapi juga makanan yang baik sebagaimana yang terkandung dalam surah *al-Baqarah*:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطَوَاتِ الشَّيْطَانِ
إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُبِينٌ ﴿١٦٨﴾

*“Wahai manusia, **makanlah** apa-apa yang di atas muka bumi yang **halal lagi baik** dan janganlah kamu mengikut langkah-langkah syaitan. Sesungguhnya syaitan merupakan musuh yang nyata bagimu.”* (2): 168

Pada masa kini, masyarakat lebih terdedah kepada makanan yang mengandungi bahan kimia dan pengawet di pasaran. Pengambilan bahan-bahan ini secara tidak langsung boleh mendatangkan kesan yang negatif kepada kesihatan dan kualiti hidup pengguna jika diambil bagi jangka masa yang panjang. Allah memerintahkan agar manusia makan makanan yang baik dan halal. Terdapat pelbagai jenis contoh makanan dari sumber semulajadi yang baik untuk kesihatan yang disarankan di dalam al-Qur'an seperti madu, kurma, kismis dan susu.

Ayat tersebut merupakan arahan serta izin langsung daripada Allah kepada manusia untuk makan apa sahaja yang halal lagi baik. Dikaitkan juga larangan mengikut langkah syaitan, yang mahu manusia mengambil makanan yang haram dan tidak baik untuk kesihatan.

Imam Ibnu Kathir dalam kitabnya *Tafsir al-Qur'an al-Azim*, menyatakan makanan yang 'baik' memberi maksud makanan yang sesuai dengan selera seseorang selain tidak memberi kesan yang buruk kepada fizikal dan mental (Danial, 2007). Hasil metabolisme makanan yang telah dihadamkan akan masuk ke dalam bekalan darah dan dibawa ke seluruh badan, termasuklah ke otak untuk digunakan oleh neuron (sel utama saraf) dan neuroglia (sel sokongan). Otak merupakan struktur utama bagi sistem saraf pusat yang merupakan sistem paling utama bagi manusia.

Terdapat pelbagai jenis makanan yang nutrienya baik untuk perkembangan dan fungsi otak yang memainkan peranan penting dalam aktiviti pembelajaran dan penghasilan memori. Makanan yang baik bukan sahaja dapat meningkatkan kemampuan otak untuk berfikir, malah ia juga meningkatkan daya tumpuan, mengurangkan tekanan dan menguatkan memori. Antara makanan yang dilaporkan baik untuk otak adalah seperti berikut:

- a) **Mempunyai fungsi antioksidan:** Antioksidan (anti-oksigen) bertindak menentang bahan radikal bebas (oksigen aktif) yang menghasilkan tindak balas kimia yang boleh merosakkan sel-sel otak jika kandungannya berlebihan. Untuk menghalang tindak balas ini, otak memerlukan bekalan antioksidan yang cukup. Selain dari madu, makanan lain yang mengandungi antioksidan adalah buah-buahan sitrus, tumbuhan hijau (The Franklin Institute, 2014) dan kurma (Zangene et al., 2009).
- b) **Mengandungi glukosa:** Glukosa merupakan sumber tenaga utama bagi otak. Glukosa ditukar dari karbohidrat, seperti bijirin, buah-buahan dan sayur-sayuran. Kajian menunjukkan pengambilan gula semulajadi dapat meningkatkan memori dan fungsi kognitif (Rodriguez, 2009). Selain glukosa, madu juga mengandungi

fruktosa dan air (Doner, 1976). Glukosa dan fruktosa merupakan monosakarida, iaitu gula ringkas.

1.2 Pernyataan Masalah

Umum mengetahui pengambilan madu adalah sebagai salah satu sumber antioksidan yang baik untuk penjagaan kesihatan. Terdapat banyak kajian saintifik yang melihat kepada kesan madu terhadap penyembuhan luka, kesuburan dan diet bagi ahli sukan. Tetapi tidak banyak kajian tentang kesan madu terutamanya madu tempatan terhadap memori, kelakuan dan juga struktur otak yang berkaitan dengan memori. Dari perspektif tradisi Islam pula, maklumat berkaitan madu dan memori juga tidak banyak yang dinyatakan sama ada dari al-Qur'an, hadith atau kitab sarjana Islam.

1.3 Objektif Kajian

Objektif khusus kajian adalah seperti berikut:

- 1) Mengetahui dan membandingkan maklumat dari perspektif sains berdasarkan kajian yang dilaporkan dalam jurnal-jurnal saintifik dan perspektif tradisi Islam berdasarkan ayat-ayat al-Qur'an, hadith-hadith dan tulisan sarjana Islam yang berkaitan dengan madu:
 - a) Penghasilan madu.
 - b) Ciri-ciri madu, contohnya aspek fizikal dan kimianya.
 - c) Penggunaan madu untuk memori.
- 2) Mengkaji kesan pengambilan madu tempatan terpilih (Madu Tualang) ke atas memori spatial haiwan eksperimen (tikus) melalui model kelakuan yang melibatkan:

- a) Komponen memori kerja.
 - b) Komponen memori rujukan.
- 3) Membuat perbandingan antara tikus yang diberikan madu tempatan terpilih (Madu Tualang) dan tikus kawalan yang diberi larutan salin dari aspek:
- a) Ciri am morfologi luaran struktur otak.
 - b) Pencirian aspek neurohistologi hipokampus, struktur otak tikus yang diketahui terlibat dengan memori.

1.4 Persoalan Kajian

Fokus kajian adalah untuk menangani persoalan-persoalan berikut:

- 1) Sejauh manakah keselarasan maklumat mengenai ciri-ciri madu itu sendiri seperti penghasilannya, fizikalnya dan kandungan kimianya serta penggunaan madu untuk meningkatkan memori dari perspektif sains dan tradisi Islam.
- 2) Jika berdasarkan kelakuan haiwan eksperimen (tikus), penggunaan madu tempatan (Madu Tualang) memberikan kesan terhadap memori spatial.
- 3) Jika penggunaan madu tempatan (Madu Tualang) memberi kesan ke atas struktur morfologi luaran dan histologi otak tikus, apakah kesan-kesan tersebut.

1.5 Kepentingan Kajian

Daripada kajian ini, maklumat dari kedua-dua perspektif sains dan tradisi Islam terutamanya tentang perkaitan madu dan memori dikumpul dan didokumentasi secara sistematik. Dapat dibentangkan kepentingan pengambilan madu dari pandangan kedua-dua perspektif.

Kajian kelakuan terhadap tikus dijalankan bagi melihat kesan pengambilan madu tempatan (Madu Tualang) terhadap prestasi memori spatialnya. Turut dilihat kesan pengambilan madu tersebut terhadap morfologi luaran otak dan histologi struktur tertentu (hipokampus). Oleh itu, kajian ini memberi maklumat sokongan fizikal dari perspektif sains tentang kesan positif madu, terutamanya terhadap memori. Keputusan kajian boleh menggalakkan pengambilan makanan sunnah ini.

BAB 2: KAJIAN LITERATUR

Terdapat banyak eksperimen melibatkan kajian kelakuan yang dijalankan bagi mengkaji kesan sesuatu makanan terhadap memori, khususnya memori spatial. Sebagai contoh, kajian yang dilakukan Shinomiya et al., (2005) yang mengkaji kesan ekstrak kulit benih kacang soya hitam ke atas prestasi tikus dalam *radial maze*. Begitu juga dengan eksperimen rintis yang dilakukan oleh Muhamad Haris et al., (2011) yang mengkaji kesan pati ikan haruan ke atas pembelajaran spatial dan memori tikus. Kajian-kajian tersebut melibatkan bahan makanan khusus, menggunakan tikus sebagai haiwan eksperimen yang dinilai melalui prestasi dalam ujian menggunakan kajian khusus.

2.1 Memori Haiwan dan Madu

Masih belum banyak kajian saintifik yang menunjukkan kesan positif madu terhadap fungsi kognitif, terutamanya memori (Jadual 2.1). Antara kajian saintifik tersebut ialah kajian yang dijalankan oleh Chepulis et al., (2009) yang melihat kesan pemberian madu terhadap memori tikus dewasa. Dalam kajian selama 52 minggu, 45 ekor tikus yang berusia dua bulan dibahagikan kepada tiga kumpulan mengikut diet yang diberikan, iaitu diet yang mengandungi 10% madu *honeydew*, 7.9 % sukrosa dan diet tanpa gula. Ujian *Y maze* dan ujian Pengenalpastian Objek (*Object Recognition Test*) dijalankan untuk menguji memori tikus, manakala ujian *Elevated Plus Maze* dijalankan untuk menilai tahap kerisauan tikus. Tikus yang diberi diet madu menunjukkan tahap memori spatial yang lebih baik pada bulan ke enam dan bulan ke dua belas berbanding tikus yang diberi diet tanpa gula dan sukrosa. Hasil kajian menunjukkan pengambilan madu dalam jangka masa yang panjang dapat mengurangkan kerisauan dan meningkatkan memori spatial pada peringkat umur pertengahan.

Terdapat dua kajian rintis mengaitkan madu dan memori yang dijalankan oleh Nabilah (2010) dan Khairul Azali (2011) yang melibatkan penggunaan madu tempatan, iaitu madu Gelam dan madu Nenas ke atas tikus jantan. Kumpulan rawatan diberi madu secara suap-paksa sebanyak 1ml/100gram berat badan manakala kumpulan kawalan diberi larutan salin (0.9%). Sepanjang pemberian rawatan akut ini, tikus-tikus tersebut menjalani ujian memori yang melibatkan penggunaan *Radial Arm Maze* (RAM) setiap lima hari untuk penilaian memori spatial. Hasil kajian menunjukkan tahap memori spatial tikus bagi kumpulan berbeza tidak menunjukkan sebarang perbezaan yang signifikan, walaupun terdapat pola/*trend* bahawa pengambilan madu tersebut memberi kesan positif. Ini mungkin kerana tempoh pemberian madu dalam jangka masa yang pendek tidak memberikan kesan signifikan kepada memori tikus (Nabilah, 2010). Hasil kajian menunjukkan madu Nenas mempunyai kesan yang positif terhadap memori kerja tikus jantan (Khairul Azali, 2011). Pada tahap neurohistologi tiada perbezaan dilihat ke atas tisu struktur hipokampus.

Terdapat kajian untuk melihat kesan pemberian akut Madu Tualang (Agromas) terhadap morfologi hipokampus dan prestasi memori tikus betina yang dibuang ovari (Badriya et al., 2013). Tikus diberi Madu Tualang secara oral (0.2g/kg berat badan) selama 15 hari. Prestasi memori tikus dinilai menggunakan ujian *novel object recognition* (NOR). Otak tikus yang diproses menggunakan pewarnaan *Nissl* menunjukkan Madu Tualang meningkatkan memori jangka panjang dan pendek serta meningkatkan bilangan neuron hipokampus tikus di kawasan CA2, CA3 dan *dentate gyrus*.

Jadual 2.1: Kajian lepas tentang perkaitan madu dan memori

Bil.	Pengkaji (tahun)	Sampel	Instrumen
1	Chepulis et al., (2009)	Tikus	<i>Y maze</i> dan Pengenalpastian Objek (<i>Object Recognition Test</i>)
2	Othman et al., (2011)	Manusia	Ujian Pembelajaran Auditori Lisan
3	Badriya et al., (2013)	Tikus	<i>Novel Object Recognition</i>

2.2 Memori Manusia dan Madu

Terdapat juga kajian yang melibatkan manusia. Contohnya Kajian yang dilakukan oleh Othman et al., (2011) menilai prestasi pembelajaran lisan dan ingatan wanita menopause yang mengambil madu lebah Tualang (Agro Mas) berbanding dengan wanita yang menerima estrogen serta terapi progestin dan kumpulan kawalan yang tidak dirawat. Kumpulan kajian yang terdiri daripada 102 orang wanita menopause telah dibahagi secara rawak kepada tiga kumpulan, iaitu kumpulan madu lebah Tualang (20 g/hari), kumpulan estrogen serta terapi progestin (Femoston 1/5) dan kawalan yang tidak dirawat. Pembelajaran lisan dan ingatan mereka telah dinilai menggunakan Ujian Pembelajaran Auditori Lisan versi Melayu sebelum dan selepas 16 minggu rawatan. Wanita menopause yang menerima madu lebah Tualang menunjukkan peningkatan dalam ingatan mereka. Ini adalah setanding dengan peningkatan yang dilihat di kalangan wanita yang menerima terapi estrogen ditambah progestin.

2.3 Kandungan dan Komposisi Madu

Kandungan dan komposisi pelbagai jenis madu adalah berbeza-beza mengikut sumber floranya, keadaan iklim dan sekeliling. Kajian yang dilakukan oleh Mohamed et al., (2010) adalah untuk menilai keamatan warna, jumlah kandungan fenolik, aktiviti antioksidan dan aktiviti antiradikal Madu Tualang yang dirawat dengan sinaran gamma. Kajian menunjukkan Madu Tualang mempunyai keamatan warna yang baik dan

mengandung sebatian fenolik yang menunjukkan aktiviti antioksidan yang baik setanding dengan jenis madu yang lain (Mohamed et al., 2010). Hasil kajian menunjukkan nilai keamatan warna ABS450 Madu Tualang ialah 489.5 ± 1.7 AU, jumlah kandungan fenolik ialah 251.7 ± 7.9 mg asid galik/kg madu, jumlah aktiviti antioksidan melalui *FRAP assay* ialah 322.1 ± 9.7 ($\mu\text{M Fe(II)}$) dan aktiviti antiradikal oleh *DPPH assay* ialah 41.30 ± 0.78 (% penyekatan). *Net absorbance* Madu Tualang adalah dalam julat pelbagai jenis madu Slovenian, seperti Chesnut, Fir, Spruce, *multifloral* dan *Forest*. Jumlah kandungan fenolik Madu Tualang dilaporkan dalam julat madu Slovenia dan madu Romania seperti madu Acacia, *Sunflower* dan *honeydew*. Jumlah aktiviti antioksidan Madu Tualang adalah dalam julat sebahagian madu Slovakia (Mohamed et al., 2010). Madu Tualang mempunyai beberapa ciri-ciri biokimia yang serupa dengan madu Manuka. Malah, mempunyai kandungan fenolik, flavonoid, dan *hydroxymethylfurfural* (HMF) yang lebih tinggi dari madu Manuka (Sarfarz & Nor Hayati, 2013).

Madu mengandungi *scavenger*¹ radikal bebas yang mengurangkan pembentukan bahan radikal bebas yang boleh mengakibatkan tekanan oksidatif². Hasil kajian yang dilakukan oleh Kishore et al., (2011) menunjukkan Madu Tualang mempunyai jumlah kandungan fenolik yang paling tinggi berbanding dengan madu Gelam, madu *Indian forest* dan madu Nenas. Data yang didapati menunjukkan Madu Tualang mempunyai kesan antioksidan yang lebih baik bagi menentang spesies oksigen reaktif³ jika dibandingkan dengan madu Gelam, madu *Indian forest* dan madu Nenas. Kandungan

¹ Bahan kimia aktif seperti vitamin, mineral atau enzim yang bertindak untuk menyingkirkan atau mengeluarkan bahan yang berbahaya dan tidak diingini sebelum ia boleh menyebabkan kerosakan sel dalam badan.

² Tekanan oksidatif pada dasarnya adalah suatu ketidakseimbangan antara penghasilan radikal bebas dan keupayaan badan untuk melawan atau menyahtoksik kesan buruk melalui peneutralan oleh antioksidan.

³ Spesies oksigen reaktif (ROS) adalah molekul reaktif secara kimia yang mengandungi oksigen. Contohnya termasuk ion oksigen dan peroksida. ROS terbentuk sebagai hasil sampingan semulajadi metabolisme normal oksigen dan mempunyai peranan penting dalam isyarat sel dan homeostasis. ROS juga mempunyai potensi untuk menyebabkan kerosakan selular selain merosakkan DNA, RNA dan protein yang menyumbang kepada fisiologi penuaan.

fenolik dan sebatian lain yang terdapat dalam madu menyebabkan *scavenging* radikal bebas dan aktiviti antioksidasi yang mendatangkan kesan positif kepada kesihatan manusia.

Kajian yang dilakukan oleh Khalil et al., (2012) tentang jumlah kandungan polifenol dan flavonoid dan sifat antioksidan melibatkan 11 sampel Madu Tualang. Sampel Madu Tualang (AgroMas®) telah dibekalkan oleh FAMA (Lembaga Pemasaran Pertanian Persekutuan, Kedah, Malaysia) dan dikumpul oleh pengumpul madu daripada 11 kawasan yang berlainan di Hutan Hujan Tropika Kedah. Sampel Madu Tualang kemudian dibanding dengan madu tropika Borneo, yang merupakan satu lagi jenis madu yang terdapat di Malaysia. Hasil kajian menunjukkan bahawa secara purata, jumlah kandungan polifenol dan flavonoid dalam Madu Tualang yang diproses adalah lebih tinggi berbanding madu tropika Borneo. Jumlah kandungan fenolik ditemui adalah lebih tinggi daripada flavonoid dan kandungan antioksidasi Madu Tualang didapati lebih tinggi daripada madu tropika Borneo.

Terdapat kajian rintis berkaitan madu berasaskan surah *al-Nahl*. Walau bagaimanapun, kajian lebih menjurus kepada kesan madu terhadap kesihatan secara keseluruhan. Contohnya, kajian yang dijalankan oleh Mohamad (1994) yang menyorot tentang khasiat madu lebah dalam sejarah perubatan Islam.

Begitu juga dengan kajian yang dilakukan oleh Deuraseh (2006) yang memfokus tentang penggunaan madu dari perspektif Islam berdasarkan kitab perubatan (*Kitab al-Tibb*) dalam *Sahih Bukhari*. Beliau membincangkan kepentingan perubatan dalam Islam yang menekankan “mencegah lebih baik daripada merawat”. Beliau turut

membincangkan kaedah rawatan dalam Islam seperti berbekam, pengkauterian dan rawatan menggunakan madu lebah.

2.4 Isu Berbangkit daripada Kajian Lampau

Berdasarkan sorotan kajian yang dilakukan, pengkaji memilih untuk melakukan kajian tentang kesan Madu Tualang ke atas memori spatial tikus. Ini adalah kerana madu adalah antara makanan yang disarankan oleh Islam untuk mengukuhkan memori. Walau bagaimanapun, tidak banyak kajian yang dilakukan tentang kesan madu terhadap memori, samada dari perspektif sains atau pun Islam. Pemilihan Madu Tualang sebagai subjek kajian kerana Madu Tualang terbukti sebagai antara madu tempatan yang mempunyai kandungan fenolik yang tinggi yang dikaitkan dengan ciri antioksida. Pengkaji memilih untuk menggunakan Madu Tualang (Agro Mas) keluaran FAMA kerana ia mudah didapati dan dijamin asli. Ujian kelakuan RAM dipilih kerana ia mudah dilakukan dan sesuai dijalankan untuk menilai memori spatial tikus. Butiran berkaitan akan dinyatakan dalam bab-bab berikut.

BAB 3: KOMPONEN KAJIAN ANALISIS DOKUMEN

3.1 Pengenalan

Dalam Islam, setiap penyakit yang diturunkan oleh Allah (s.w.t.) mempunyai penawar, seperti sabda Rasulullah (s.a.w.):

مَا أُنْزِلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أُنْزِلَ لَهُ شِفَاءٌ

Allah tidak menurunkan penyakit kecuali ia telah menetapkan baginya penawar (Muhammad Fu'ad, t.t).

Oleh itu manusia perlu berusaha dalam mencari penawar bagi sesuatu penyakit selagi ianya tidak melanggar hukum/syara'. Madu adalah bahan yang dihasilkan oleh lebah, iaitu salah satu makhluk Allah (s.w.t.). Madu dikatakan memberi kesan positif terhadap memori sama ada dari perspektif sains atau tradisi Islam. Namun begitu, tidak banyak kajian yang mengintegrasikan maklumat dari kedua-dua perspektif. Perbandingan analisis dokumen, kaitan madu dengan memori berpotensi mengetengahkan kepentingan perbincangan sarjana seumpama ini dalam kedua-dua bidang.

Kaedah analisis dokumen digunakan untuk komponen kajian ini. Analisis dokumen adalah proses yang melibatkan aktiviti pengumpulan data melalui penyelidikan, penyiasatan, pemeriksaan, pencerakinan dan penganalisan terperinci yang dibuat terhadap bahan bertulis yang berkaitan dengan perkara yang dikaji (Jabatan Penyelidikan dan Penilaian Institut Aminuddin Baki, 2012).

3.2 Metodologi

Dari perspektif Islam, sumber-sumber seperti ayat al-Qur'an, hadith dan tulisan sarjana ada menyebut tentang madu dan memori. Maklumat yang diperolehi dari sumber-sumber tersebut dikumpul, disusun dan diselaras. Sumber rujukan dari tradisi Islam adalah seperti al-Qur'an, tafsir al-Qur'an seperti Tafsir Pimpinan al-Rahman, hadith seperti dari kitab Sahih Bukhari dan Sunan Ibnu Majah serta kitab tulisan sarjana Islam seperti kitab *Qanun fi Tibb* dan *Tibb Nabawi*. Bahan-bahan rujukan dari perspektif sains lebih menjurus kepada penerbitan hasil kajian makmal. Terdapat juga bahan rujukan yang melibatkan buku teks.

Bahan-bahan rujukan dalam bentuk buku teks dan kajian ilmiah ini diperolehi daripada beberapa perpustakaan di Universiti Malaya seperti Perpustakaan Utama dan Perpustakaan Akademi Pengajian Islam. Bahan rujukan sains seperti buku dan ensiklopedia turut diperolehi dari perpustakaan tersebut. Bahan rujukan elektronik dari internet juga turut digunakan. Enjin carian *Google* atau *Google Scholar* digunakan untuk mencari bahan rujukan berkaitan. Kata kunci yang digunakan seperti madu/*honey*, memori/*memory*, kelakuan - kelakuan/*behavior* dan hipokampus/*hippocampus*. Laman web berautoriti yang digunakan seperti Pubmed, ScienceDirect, lidwa.com, Islamweb dan IslamiCity.com.

3.3 Keputusan

3.3.1 Madu dari Perspektif Islam

3.3.1.1 Saranan Penggunaan Madu Oleh al-Qur'an

Madu atau dalam bahasa arab ‘*asal*’ berasal daripada perkataan ‘*asala*’. Jamaknya ‘*a’sal*’, ‘*usl*’, ‘*usul*’, ‘*usul*’ dan ‘*uslan*’ yang bermaksud air liur lebah (Ma’luf, 1973). Allah memuliakan madu dengan menjadikannya sebagai nikmat balasan kepada orang-orang yang bertaqwa di dalam syurga seperti yang terdapat di dalam surah *Muhammad* (47) ayat 15:

مَثَلُ الْجَنَّةِ الَّتِي وُعدَ الْمُتَّقُونَ فِيهَا أَنْهَارٌ مِنْ مَّاءٍ غَيْرِ آسِنٍ وَأَنْهَارٌ مِنْ لَبَنٍ
لَمْ يَتَغَيَّرَ طَعْمُهُ ، وَأَنْهَارٌ مِنْ خَمْرٍ لَذَّةٍ لِلشَّارِبِينَ وَأَنْهَارٌ مِنْ عَسَلٍ مُصَفًّى
وَلَهُمْ فِيهَا مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ وَمَغْفِرَةٌ مِنْ رَبِّهِمْ كَمَنْ هُوَ خَالِدٌ فِي النَّارِ وَسُقُوا
مَاءً حَمِيمًا فَقَطَّعَ أَمْعَاءُهُمْ ﴿١٥﴾

“(Apakah) perumpamaan (penghuni) syurga yang dijanjikan kepada orang-orang yang bertakwa yang di dalamnya ada sungai-sungai dari air yang tiada berubah rasa dan baunya, sungai-sungai dari air susu yang tiada berubah rasanya, sungai-sungai dari khamar (arak) yang lazat rasanya bagi peminumnya dan sungai-sungai dari madu yang disaring; dan mereka memperoleh di dalamnya segala macam buah-buahan dan ampunan dari Tuhan mereka, sama dengan orang yang kekal dalam neraka dan diberi minuman dengan air yang mendidih sehingga memotong-motong ususnya? (15)” (47): 15

Lafaz ‘*asal*’ dalam ayat ini diikuti dengan lafaz *musaffa* diterjemahkan sebagai “disaring”. *Musaffa* menunjukkan bahawa sifat madu itu yang sangat bersih, elok warnanya, rasanya dan baunya serta kekal di dalam perut lebah sebelum ia bercampur dengan lilin (sarang lebah) dan bahan-bahan semulajadi lain oleh lebah (Hawwa, 1999).

Ayat ini menunjukkan kenikmatan yang dikurniakan kepada orang yang bertakwa di dalam syurga adalah berupa sungai madu yang mengalir di dalamnya. Walau bagaimanapun, seperti yang dinyatakan di dalam hadith oleh Ibn ‘Abbas, madu yang terdapat di dalam syurga bukanlah madu yang biasanya berasal dari perut lebah, tetapi madu *musaffa* (Kathir al-Qurasyi, 1998).

Hal ini juga turut dinyatakan oleh hadith yang diriwayatkan oleh al-Darimi, dengan penambahan bahawa terdapatnya lautan madu yang daripadanya mengalir sungai madu (Abdullah, 1987):

أَخْبَرَنَا يَزِيدُ بْنُ هَارُونَ قَالَ: أَخْبَرَنَا الْجُرَيْرِيُّ عَنْ حَكِيمِ بْنِ مُعَاوِيَةَ عَنْ
أَبِيهِ أَنَّ رَسُولَ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ: إِنَّ فِي الْجَنَّةِ بَحْرَ اللَّبَنِ
وَبَحْرَ الْعَسَلِ وَبَحْرَ الْخَمْرِ ثُمَّ تَشَقُّ مِنْهُ الْأَنْهَارُ.

Yazid bin Harun memberitahu kami, al-Juraiiri memberitahu kami, dari Hakim bin Mu'awiyah, dari ayahnya, ia bercerita: Aku pernah mendengar Rasulullah (s.a.w) bersabda: “Di dalam syurga itu terdapat lautan susu, lautan air, lautan madu, dan lautan khamr. Kemudian sungai-sungai itu mengalir darinya.”

Tradisi Islam sememangnya menganjurkan penggunaan madu (Maula, 2009). Di dalam al-Qur'an terdapat satu surah yang merujuk kepada lebah, iaitu surah ke-16 yang dinamakan sebagai surah *al-Nahl*. Surah ini terdiri daripada ayat 128 dan merupakan surah *makkiyyah*, kecuali tiga ayat terakhir. Ia diturunkan ketika kembalinya Rasulullah daripada perang Uhud. Ia dinamakan surah *al-Nahl* yang bermaksud lebah kerana di dalamnya terdapat ayat yang bermaksud “Dan Tuhanmu memberi ilham kepada lebah”. Ia juga dinamakan surah *al-Ni'am* yang bermaksud pelbagai nikmat kerana di dalamnya terdapat pelbagai nikmat yang dinyatakan oleh Allah (s.w.t.)

(Universitas Islam Indonesia, 1995). Ayat 68 dan 69 dalam surah *al-Nahl* menyebut tentang madu dan kebaikannya.

وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنْ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا
يَعْرِشُونَ ﴿٦٨﴾ ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا
يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ
لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿٦٩﴾

“Dan Tuhanmu memberi ilham kepada lebah: “Hendaklah engkau membuat sarangmu di gunung-ganang dan di pokok-pokok kayu, dan juga di bangunan-bangunan yang didirikan oleh manusia. (68). Kemudian makanlah dari segala jenis bunga-bunga dan buah-buahan (yang engkau sukai), serta turutlah jalan-jalan peraturan Tuhanmu yang diilhamkan dan dimudahkannya kepadamu. (Dengan itu) akan keluarlah dari dalam badannya minuman (madu) yang berlainan warnanya, yang mengandung penawar bagi manusia (dari berbagai-bagai penyakit). Sesungguhnya pada yang demikian itu, ada tanda (yang membuktikan kemurahan Allah) bagi orang-orang yang mahu berfikir. (69)” (16): 68,69

Ayat tersebut menggambarkan tugas-tugas lebah yang kemudiannya dikaitkan dengan madu. Lafaz “*ittahizi*” dalam ayat 68 adalah sebagai bentuk perintah kepada lebah, yang dalam bentuk “*muannath*”, iaitu kata ganti nama diri bagi betina/perempuan. Ini bersesuaian dengan kehidupan sesebuah koloni lebah yang diketuai oleh seekor ratu lebah betina dan bilangan lebah betina adalah lebih banyak daripada lebah jantan (Najib, 2008).

Ayat tersebut menunjukkan suruhan kepada lebah supaya makan pelbagai jenis sumber bunga-bungaan dan buah-buahan seterusnya menghasilkan madu yang bermacam-macam warna. Oleh itu, madu yang dihasilkan mengandungi pelbagai jenis zat dan kebaikan dari pelbagai jenis sumber (Najib, 2008).

Ayat 69 pula secara khusus menyatakan bahawa di dalam madu lebah terdapat ubat yang mempunyai keupayaan menyembuhkan bagi manusia. Terdapat percanggahan pendapat dalam kalangan ulama' mengenai maksud "*yang mengandungi penawar bagi manusia*". Ada pendapat yang mengatakan *dhomir* (kata ganti nama) pada lafaz "فيه" yang bermaksud di dalam (nya) merujuk kepada al-Qur'an sebagai ubat. Namun jumhur ulama' bersependapat bahawa *dhomir* (kata ganti nama) tersebut merujuk kepada madu sebagai ubat (Najib, 2008).

Ulama' juga bercanggah pendapat dalam mentafsir ayat yang bermaksud "*yang mengandungi penawar bagi manusia*". Ada ulama' yang berpendapat bahawa ayat ini bersifat umum, iaitu menjadi penyembuh kepada semua jenis penyakit dan semua manusia (Najib, 2008). Ibnu Hajar pula dalam kitabnya *Fath al-Bari* menyatakan bahawa pernyataan "*yang mengandungi penawar bagi manusia*" menggambarkan bahawa tidak semestinya madu sesuai untuk semua jenis orang. Sesetengah orang dijangka tidak sesuai menggunakan madu terutamanya orang yang tinggal di kawasan bersuhu tinggi (Deuraseh, 2006). Walau bagaimanapun, semua bersetuju bahawa madu boleh berfungsi bagi manusia.

3.3.1.2 Saranan Penggunaan Madu oleh Hadith

Saranan penggunaan madu oleh al-Qur'an disokong oleh hadith yang diturunkan kepada Rasulullah (s.a.w.). Terdapat beberapa hadith yang menyebut tentang penggunaan madu, seperti hadith dari Ibnu Majah yang menyarankan penggunaan madu sebagai penyembuh, selain daripada al-Qur'an. Sabda Rasulullah (s.a.w.) (Muhammad Yusuf, 1987):

عَلَيْكُمْ بِالشِّفَاءَيْنِ الْعَسَلِ وَالْقُرْآنِ

“Ambillah/ pergunakanlah oleh mu sekalian akan dua ubat penyembuh iaitu madu dan al-Qur'an.”

Hadith tersebut menggalakkan supaya menggabungkan dua jenis perubatan, iaitu perubatan bagi fizikal dengan menggunakan madu dan perubatan bagi rohani dengan menggunakan al-Qur'an. Ini mungkin lebih meyakinkan bagi mereka yang masih ragu-ragu terhadap perubatan yang hanya bergantung kepada al-Qur'an semata-mata dan merasakan tidak memadai tanpa ikhtiar lain, iaitu penggunaan ubat (Mohamad, 1994). Pernyataan tentang penggunaan madu dengan al-Qur'an di dalam hadith ini menunjukkan kelebihan madu sebagai penawar yang istimewa (Najib, 2008). Sebagaimana kata Ibnu Mas'ud (Shamsuddin Muhammad, 1994):

الْعَسَلُ شِفَاءٌ مِنْ كُلِّ دَاءٍ وَالْقُرْآنُ شِفَاءٌ لِمَا فِي الصُّدُورِ، فَعَلَيْكُمْ بِالشِّفَاءَيْنِ
الْقُرْآنِ وَالْعَسَلِ.

“Madu adalah penawar bagi setiap penyakit dan al-Qur'an adalah penawar bagi hati, maka bagi kamu terdapat dua penawar iaitu al-Qur'an dan madu”.

Terdapat persamaan antara madu dan al-Qur'an. Madu terhasil dari nektar berbagai-bagai jenis bunga dan menjadi penawar kepada pelbagai jenis penyakit yang dihadapi oleh manusia. Manakala al-Qur'an pula mempunyai kisah-kisah dan pengajaran-pengajaran tentang nabi dan umat terdahulu yang dilengkapi dengan petunjuk-petunjuk yang boleh digunakan oleh manusia tidak mengira bangsa dan zaman untuk kesejahteraan di dunia dan akhirat (Universitas Islam Indonesia, 1995). Al-Qur'an sebagai mukjizat juga dicadangkan mempunyai auranya yang tersendiri sehinggakan dengan membaca dan/atau mendengarnya juga boleh menjadi terapi.

Penggunaan madu dalam penjagaan kesihatan telah diamalkan sejak zaman Rasulullah (s.a.w.) dan para sahabat. Madu adalah antara makanan kegemaran Rasulullah (s.a.w.) sendiri sebagaimana yang dinyatakan oleh hadith yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari. Kata Aisyah (Muhammad, 1987):

كَانَ النَّبِيُّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ يُعْجِبُهُ الْحُلُوءُ وَالْعَسَلُ

“Nabi (s.a.w) amat gemar pada makanan yang manis-manis dan madu.”

Terdapat hadith-hadith yang menyebut tentang kemampuan madu menyembuhkan penyakit manusia. Ada diantaranya merujuk kepada penyakit yang khusus dan terdapat juga hadith yang tidak menyatakan secara jelas penyakit yang boleh dirawat dengan madu. Sebagaimana yang terdapat dalam *Sahih Bukhari* dalam kitab *al-Tibb, Bab al- Shifa' fi Thalatha*, terdapat dua hadith yang diriwayatkan oleh Ibn 'Abbas. Hadith pertama adalah (Muhammad, 1993):

الشِّفَاءُ فِي ثَلَاثَةِ شَرْبَةِ عَسَلٍ وَشَرْطَةِ مِحْجَمٍ وَكَيْتَةِ نَارٍ وَأَنْهَى أُمَّتِي
عَنْ الْكَيِّ

“Kesembuhan dari penyakit itu adalah dengan melakukan tiga perkara: minum madu, berbekam dan membakar dengan api. Tetapi aku melarang umat ku membakar dengan api”.

Hadith yang kedua adalah (Muhammad, 1993):

الشِّفَاءُ فِي ثَلَاثَةِ فِي شَرْطَةِ مِحْجَمٍ أَوْ شَرْبَةِ عَسَلٍ أَوْ كَيْتَةِ بِنَارٍ وَأَنَا
أَنْهَى أُمَّتِي عَنْ الْكَيِّ

“Kesembuhan dari penyakit itu adalah dengan melakukan tiga perkara, berbekam, minum madu, dan membakar dengan api. Tetapi aku melarang umat ku membakar dengan api”.

Merujuk kepada hadith-hadith tersebut, Ibn Hajar menjelaskan bahawa Rasulullah (s.a.w.) hanya menyenaraikan tiga cara rawatan kerana ia adalah prinsip rawatan bagi sesuatu penyakit. Ini adalah berkemungkinan kerana beberapa penyakit yang muncul dalam kalangan kaum Arab pada waktu tersebut kebanyakannya berpunca dari darah (Deuraseh, 2006).

عَنْ أَبِي سَعِيدٍ (أَنَّ رَجُلًا أَتَى النَّبِيَّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ فَقَالَ أَخِي
يَشْتَكِي بَطْنَهُ فَقَالَ اسْقِهِ عَسَلًا ثُمَّ أَتَى الثَّانِيَةَ فَقَالَ اسْقِهِ عَسَلًا ثُمَّ أَتَاهُ
الثَّالِثَةَ فَقَالَ اسْقِهِ عَسَلًا ثُمَّ أَتَاهُ فَقَالَ قَدْ فَعَلْتُ فَقَالَ صَدَقَ اللَّهُ وَكَذَبَ
بَطْنُ أَخِيكَ اسْقِهِ عَسَلًا فَسَقَاهُ فَبَرَأَ)

Dari Abu Sa'id (r.a.): “Ada seorang laki-laki datang kepada Rasulullah s.a.w dan berkata: “Saudara saya sakit perut.” Rasul menjawab: “Beri ia madu!” Kemudian orang itu datang lagi untuk kedua kalinya. Rasul

*berkata lagi: “Berilah **madu**!” Kemudian orang itu datang untuk ketiga kalinya. Rasul berkata lagi: “Berilah **madu**!” Kemudian orang itu datang lagi dan berkata: “Telah saya lakukan.” Rasul menjawab: “Tuhan benar. Perut saudara mu yang bohong. Berilah **madu**!” Setelah itu diberikannya lagi **madu** kepada saudaranya, dan sembuhlah penyakitnya.”*

Hadith ini pula menceritakan tentang saudara kepada seorang lelaki yang mengalami sakit perut (Muhammad, 1987). Lalu Rasulullah (s.a.w.) menyuruhnya supaya berubat dengan madu. Kekerapan lelaki tersebut datang mengadu kepada Rasulullah (s.a.w.) sebanyak empat kali menunjukkan madu mampu menyembuhkan penyakit dengan cara digunakan beberapa kali dan memerlukan masa untuk mendatangkan kesan (Najib, 2008). Namun begitu, tidak dinyatakan di dalam hadith tentang dos yang diperlukan dan kekerapan pengambilan madu yang diperlukan untuk merawat penyakit ini. Pemeriksaan dan rawatan susulan juga diperlukan bagi memastikan sesuatu penyakit benar-benar sembuh.

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ قَالَ: (قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ مَنْ لَعِقَ
الْعَسَلَ ثَلَاثَ عَدَوَاتٍ كُلَّ شَهْرٍ لَمْ يُصِبْهُ عَظِيمٌ مِنَ الْبَلَاءِ)

*Dari Abu Hurairah, dia berkata: Rasulullah (s.a.w.) bersabda: “Barangsiapa yang menjilat **madu** sebanyak tiga kali pagi pada setiap bulan, maka dia tidak akan terkena cubaan yang besar.” (Muhammad Fu’ad Abdul Baqi, t.t).*

Hadith ini pula menyatakan tentang sesiapa yang mengambil madu dengan kekerapan yang dinyatakan tiga kali setiap bulan, ia mampu menguatkan sistem imun dan dapat mengelakkan seseorang itu daripada terkena jangkitan penyakit (Najib, 2008).

3.3.1.3 Saranan Penggunaan Madu oleh Cendekiawan Islam

Kelebihan madu berkait dengan memori ada disebut oleh para cendekiawan Islam seperti Imam al-Zuhri, Ibnu Sina, al-Kindi dan Ibnu al-Jazzaar. Seperti yang dinyatakan oleh Ibnu Juraij, Imam al-Zuhri telah berkata dalam *Kitab Tibb an-Nabawi* susunan Imam Ibnu Qayyim al-Jauziyyah (Ibn Al-Qaiyim Al-Jauziyah, 1997):

عليك بالعسل، فإنه جيد للحفظ، وأجوده أصفاه وأبيضه، وألينه حدة،
وأصدق حلاوة، وما يؤخذ من الجبال والشجر له فضل على ما يؤخذ
من الخلایا، وهو بحسب مرعى نحلہ

*“Hendaklah engkau selalu menggunakan **madu**, kerana sesungguhnya ia bagus untuk mengingat (hafalan); manakala madu yang paling bagus ialah yang paling jernih dan putih; yang paling lunak adalah yang paling manis; dan madu yang paling asli adalah yang manis. Madu yang dipungut daripada bukit dan pokok adalah lebih baik daripada yang dipelihara, iaitu berdasarkan habitat lebah”*

Menurut Ibn Sina dalam kitab *Qanun fi Tibb*, madu bukan sahaja boleh menajamkan minda malah digunakan untuk merawat luka dan ulser serta mencerahkan penglihatan (Ibn Sina, 1999). Potensi madu dikaitkan dengan melancarkan peredaran darah dan membekalkan bekalan oksigen ke seluruh anggota badan, termasuklah otak (Deuraseh, 2006).

Terdapat juga penulisan cendekiawan Islam yang menggunakan madu sebagai salah satu ramuan dalam resepi makanan bagi meningkatkan memori, seperti al-Kindi dan Ibnu al-Jazzaar. Madu dicampurkan dengan bahan-bahan lain seperti biji seleri, safron dan halia. Dalam kitab *Aqrabadhin*, al-Kindi telah menulis resepi (Jadual 3.1a) bagi orang yang mengalami kemerosotan memori akibat kelembapan dan *cold humours*

(*akhlaat*)⁴. Disyorkan bahawa resepi ini baik bagi kemerosotan memori, penajaman akal fikiran, mengeringkan lidah dan pemanasan badan (Levey, 1966). Rufus of Epahusus, seorang doktor pada zaman Greek kuno telah menyatakan bahawa keadaan yang sejuk dan lembap merosakkan memori (Ullman, 1997). Manakala Ibnu al-Jazzar dalam kitab *Zad al-Musafir wa-qut al-hadir* juga menulis resepi (Jadual 3.1b) untuk meningkatkan memori (Pormann & Savage-Smith, 2007). Resepi campuran melibatkan madu ini agak susah untuk dituruti dan tidak ada maklumat tentang asal usul campuran.

Jadual 3.1: Resepi dan preskripsi melibatkan madu

<p>(a) Resipi dan preskripsi oleh al-Kindi (dalam kitab <i>Aqrabadhin</i>) bagi orang yang mengalami kemerosotan memori.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Dua bahagian biji saderi dan satu bahagian <i>new sweet flag</i> ditapis dan ditimbang dengan menggunakan kain sutera. 2) Minyak sapi dicampurkan dengan bahan tersebut dan diuli dengan buih madu (nisbah 1:5). 3) Campuran tersebut diletakkan di dalam sebuah belanga atau bekas kaca selama 40 malam. <p><u>Preskripsi:</u> 1.5 <i>dirham</i> untuk hari pertama dan bertambah dalam kuantiti yang sedikit setiap hari sehingga dos menjadi dua <i>mithqal</i> pada hari ketujuh.</p> <p><i>*1 dirham=3.2 gram, 1 mithqal= 4.25 gram</i></p>
<p>(b) Resipi dan preskripsi oleh Ibn al-Jazzaar (di dalam kitab <i>Zad al Musafir wa – qut al-hadir</i>) untuk meningkatkan memori.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Bahan-bahan berikut dilumat, diayak, dicampur dan diuli dengan madu <i>thyme</i> liar. <ul style="list-style-type: none"> • Tujuh <i>mithqal</i> kayu manis Cina, <i>sweet cost</i>, <i>Indian spikenard</i>, safron, jintan manis, halia, daun pudina kering, <i>wild mountain thyme</i>, <i>mountain mint</i> dan kulit kayu manis.

⁴ Sistem perubatan Unani yang juga dikenali sebagai sistem perubatan Greeko-Arab, diasaskan oleh Hipokrates, yang mengandaikan kehadiran empat bendalir badan yang dikenali sebagai *akhlaat* (humor) iaitu darah (kepala), kahak (paru-paru), hempedu (pundi hempedu) dan hempedu hitam (limpa). Kualiti dan kuantiti humor yang tidak seimbang boleh mengakibatkan penyakit manakala pemulihan keseimbangan ini mengekalkan kesihatan seseorang. Teori humoral ini telah diterima dan dikembangkan oleh doktor Arab-Muslim seperti al-Razi, Ibnu Sina dan al-Zahrawi.

- Empat *mithqal Indian malabathron*, lada panjang, lada putih, lada hitam, *asarabacca*, biji plum, *cultivated caraway*, bunga cengkih, lengkuas dan lobak merah liar.
- Dua *mithqal pellitory*, pelaga, biji lobak putih dan biji *turnip*.
- Sebelas *mithqal* bijan yang dibuang kulitnya, walnut, kacang pistacio, badam segar dan *pinenuts sugar candy*.

2) Bahan yang telah dicampur, disimpan di dalam bekas yang mempunyai permukaan dalam yang licin yang diwasap dengan *Indian aloes*.

Preskripsi: Campuran tersebut hendaklah diambil sebelum dan selepas makan dalam saiz sebesar kacang walnut.

*1 dirham=3.2 gram, 1 *mithqal*= 4.25 gram

Terdapat juga tulisan sarjana Islam yang menyarankan jenis madu yang baik berdasarkan fizikalnya dan penghasilannya. Imam al-Zuhri dalam *Kitab Tibb an-Nabawi* susunan Imam Ibnu Qayyim al-Jauziyyah menyatakan madu yang terbaik adalah madu yang mempunyai warna putih, jernih, manis dan dihasilkan oleh lebah liar yang bersarang di bukit-bukit dan pokok-pokok. Kepelbagaian jenis zat gula yang terkandung di dalam madu mempengaruhi warna madu yang dihasilkan. Jenis zat gula yang berbeza menyebabkan warna madu yang dihasilkan berbeza-beza. Oleh itu, madu yang berbeza warnanya mempunyai khasiat yang berbeza.

3.3.2 Madu dari Perspektif Sains

3.3.2.1 Khasiat Madu

Penggunaan madu dalam kehidupan manusia telah bermula sejak dahulu lagi merentasi pelbagai benua dan tamadun. Sebagai contoh orang pada zaman tamadun Mesir telah menggunakan madu untuk mengubat luka dan penyakit usus (Al-Jabri, 2005). Madu terbukti secara saintifik mempunyai pelbagai kesan terapeutik. Ini termasuk kesan *cardioprotective*, *hepato-protective*, hipoglisemik, antioksidan, kesan

antihipertensi, antibakteria, anti-kulat, anti-virus, anti-radang dan antitumor (Erejuwa et al., 2012).

3.3.2.2 Penghasilan Madu

Semua madu berasal dari nektar, cecair yang dihasilkan oleh kumpulan sel khusus yang dipanggil nektaris. Nektar adalah larutan yang utamanya terdiri daripada gula, asid amino, protein, lipid, mineral, dan beberapa bahan kimia yang lain. Kandungan madu boleh jadi berbeza-beza bergantung kepada sumber nektar. Kandungan nektar pula adalah pelbagai, bergantung kepada spesis tumbuhan dan keadaan persekitaran. Sebagai contoh jenis gula yang terkandung dalam nektar juga adalah berbeza. Pematangan nektar menjadi madu adalah gabungan daripada dua proses, iaitu penukaran sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa serta pengewapan air yang berlebihan (Ball, 2007). Jadual 3.2 menunjukkan purata kandungan gula yang biasanya terdapat di dalam madu.

Madu boleh dikelaskan berdasarkan sumber nektar. Madu sama ada unifloral (madu dihasilkan dari sumber debunga yang sama) atau multifloral (madu dihasilkan dari sumber debunga yang berbeza). Kepelbagaian warna dan kepekatan madu juga bergantung kepada sumber madu (Subrahmanyam, 2007). Antara faktor yang boleh mempengaruhi komposisi dan sifat madu adalah sumber nektar (bahan makanan lebah) dan juga iklim yang mempengaruhi penghasilan nektar oleh tumbuh-tumbuhan (Aljady et al., 2000). Sumber nektar juga digunakan untuk penamaan madu, contohnya madu Gelam dan madu Nenas, dua madu tempatan yang namanya adalah merujuk kepada sumber nektar, iaitu dari pokok gelam (*Melaleuca spp*) dan pokok nenas (*Ananas Comosus spp*) (Rozaini et al., 2004).

Penggunaan madu di Malaysia juga semakin meluas. Dengan adanya pelbagai jenis madu di pasaran, rakyat Malaysia semakin menyedari kepentingan madu dalam penjagaan kesihatan. Beberapa contoh jenis madu tempatan asli yang boleh didapati adalah madu Gelam, madu Nenas (Rozaini et al., 2004), Madu Tualang, madu Kelapa dan madu Durian (Ainul Hafiza et al., 2005). Namun, tidak semua madu yang terdapat di pasaran adalah madu tempatan dan asli. Pembekal dan/atau penjual madu yang ingin mengaut keuntungan menyebabkan madu tempatan yang asli amat sukar diperolehi.

Terdapat kajian yang telah dijalankan di Fakulti Perubatan, Universiti Malaya bagi menentukan keaslian madu, iaitu pencirian gula utama yang terdapat di dalam madu sebagai penunjuk keaslian sesuatu madu (M. Yusof et al., 2010). Sebanyak empat sampel madu asli tempatan, 61 sampel madu pasaran dan sembilan sampel madu import telah diuji dalam kajian ini. Keaslian jenis madu adalah berdasarkan kriteria seperti fruktosa/nisbah glukosa, jumlah gula penurun, peratusan sukrosa dalam sampel madu dan analisis pola kromatogram. Keputusan menunjukkan madu asli boleh dibezakan daripada madu yang tidak asli dan sintetik berdasarkan kandungan gula utama masing-masing. Hanya 14.75% dari madu yang telah diuji dalam kajian ini menunjukkan ciri-ciri madu asli.

Kebanyakan madu yang terdapat di pasaran, diragui keasliannya. Adalah sukar bagi para pembeli untuk menentukan keaslian madu yang dibeli secara saintifik. Sesetengahnya hanya menguji keaslian madu dengan cara tradisional yang belum tentu kesahihannya. Ini adalah kerana ujian yang dijalankan bagi menentukan keaslian madu hanya boleh dilakukan di makmal menggunakan peralatan yang khusus yang mahal. Oleh itu, kajian lanjut perlu dijalankan untuk menghasilkan satu kit yang mudah dan

murah yang boleh digunakan oleh orang ramai untuk menguji keaslian madu yang dibeli.

3.3.2.3 Kandungan Madu

Madu import mempunyai profil gula yang berlainan dari madu tempatan. Menurut piawaian Eropah bagi madu asli, kandungan *reducing sugar* (fruktosa, glukosa dan maltosa) dalam sampel madu asli hendaklah tidak kurang daripada 60%. Walau bagaimanapun, peratusan *reducing sugar* dalam madu dari negara tropika seperti Malaysia mungkin lebih rendah daripada 60% disebabkan oleh kelembapan yang tinggi. Selain itu, nisbah fruktosa/ glukosa bagi madu asli mungkin berbeza-beza dari 0.9-1.35 (Tan, 2013).

Jadual 3.2: Kandungan madu (Ball, 2007).

Komponen	Purata (%)
Air	17.2
Fruktosa	38.4
Glukosa	30.3
Sukrosa	1.3
Disakarida lain	7.3
<i>Higher sugars</i>	1.4
Asid glukonik	0.57
Asid (kecuali glukonik)	0.43
Lakton	0.14
Mineral	0.17
Nitrogen	0.04

Menurut kajian sains, selain mengandungi gula (seperti glukosa dan fruktosa), madu juga mengandungi pelbagai bahan fitokimia (seperti fenol, asid organik, vitamin, dan enzim) (Jadual 3.2) (Gheldof & Engeseth, 2002).

3.3.2.4 Kandungan Madu dan Memori

Keberkesanan madu dalam meningkatkan memori dipengaruhi beberapa faktor iaitu kandungan glukosa dan aktiviti antioksidan dalam madu:

a) Kandungan Glukosa Dalam Madu

Secara fisiologi, karbohidrat ditukar menjadi glukosa, iaitu sumber tenaga utama bagi otak. Oleh itu, glukosa dalam madu berfungsi sebagai sumber tenaga. Kajian yang dilakukan ke atas sekumpulan pelajar kolej mendapati pengambilan glukosa meningkatkan memori. Glukosa juga memainkan peranan untuk meningkatkan proses mengingat dalam kalangan pelajar-pelajar tersebut (Korol & Gold, 1998).

Kajian awal menunjukkan bahawa glukosa atau sesuatu metabolit mungkin mengaktifkan pelepasan peneuropancar asetilkolin pada tikus ketika ia terlibat dalam proses pembelajaran (Korol & Gold, 1998). Asetilkolin adalah suatu peneuropancar yang memainkan peranan penting dalam fungsi saraf, termasuk pembelajaran dan memori (National Institute on Aging Alzheimer's Disease, t.t.). Selain itu, Heitkamp (1984) sebagai mana dipetik oleh Stefan Bogdanov et al. (1998) pula menyatakan madu itu sendiri mengandungi 0.3-25 mg/kg kolin dan 0.06 5 mg/kg asetilkolina. Kolin adalah penting untuk fungsi kardiovaskular, otak serta komposisi membran sel dan pembaikannya (Bogdanov et al., 2008).

Sepanjang proses pembelajaran yang melibatkan memori spatial, kadar pelepasan asetilkolin dalam hipokampus tikus, iaitu (struktur yang berperanan dalam pembelajaran dan ingatan), adalah lebih tinggi berbanding dengan asetikolin yang dilepaskan ketika tikus duduk dengan tenang di dalam sangkar (Ragozzino et al., 1996). Walau bagaimanapun, kadar glukosa darah yang tinggi melemahkan prestasi memori

(Riby et al., 2009). Pengambilan gula semulajadi dapat meningkatkan memori dan fungsi kognitif (Rodriguez, 2009).

b) Aktiviti Antioksidan Madu

Maklumat sedia ada menunjukkan kandungan antioksidan dalam madu mengurangkan kerisauan dan meningkatkan memori spatial tikus (Chepulis et al., 2009). Memori spatial adalah berkaitan ruang. Antioksidan bertindak menentang bahan radikal bebas (oksigen aktif) yang menghasilkan tindak balas kimia yang boleh merosakkan sel-sel otak (neuron). Kerosakan oksidatif kepada komponen selular merosakkan fungsi fisiologi. Untuk menghalang tindak balas ini, otak memerlukan bekalan antioksidan yang cukup (The Franklin Institute, 2014).

Terdapat banyak maklumat yang mengaitkan perkembangan penyakit manusia dengan “tekanan oksidatif” (Aljady & Kamaruddin, 2004). Istilah “tekanan oksidatif” menjelaskan kurangnya keseimbangan antara radikal bebas yang dijana dan aktiviti perlindungan antioksidan dalam organisma. Ini boleh diakibatkan oleh peningkatan pengeluaran dan/atau pengurangan penyingkiran spesis reaktif oleh pertahanan antioksidan.

Oleh kerana beberapa penyakit-penyakit adalah akibat daripada kerosakan oksidatif, berkemungkinan sebahagian daripada sifat-sifat terapeutik madu adalah disebabkan oleh kapasiti antioksidanya (Ferreira et al., 2009). Perlindungan antioksidan terhadap pengoksidaan adalah untuk mencegah beberapa penyakit kronik seperti penyakit kardiovaskular, strok, kanser, penyakit respiratori kronik dan kencing manis (Hussein et al., 2011). Madu yang diambil secara berasingan atau dengan kombinasi

dengan rawatan konvensional, mungkin memberi faedah terapeutik dalam pengurusan penyakit kronik yang sering dikaitkan dengan tekanan oksidatif (Erejuwa et al., 2012).

Kajian menunjukkan madu didapati kaya dengan antioksidan yang penting termasuk glukosa oksidase, katalase, asid askorbik, flavonoid, asid fenolik, derivatif karotenoid, asid organik, hasil tindak balas *Maillard*, asid amino dan protein (Bogdanov et al., 2008). Tindak balas *Maillard* menyumbang kepada penuaan semulajadi dan normal tisu dan dalam keadaan berlebihan ia menyumbang kepada perkembangan keadaan patologi dalam beberapa penyakit kronik yang berkaitan dengan usia termasuk penyakit neurodegeneratif. Sebahagian besar polifenol di dalam madu adalah flavonoid seperti *ellagic acid*, *gallic acid*, *syringic acid*, *benzoic acid*, *cinnamic acid*, *ferulic acids*, *myricetin*, *chlorogenic acid*, *caffeic acid*, *hesperetin*, *coumaric acid*, *isoramnetin*, *chrysin*, *quercetin*, *galangin*, *luteolin* dan *kaempferol* (Erejuwa et al., 2012). Bahan tersebut diketahui mempunyai sifat antioksidan (Bogdanov et al., 2008). Kandungan elemen-elemen ini berbagai-bagai mengikut sumber nektar dan persekitaran madu dihasilkan (Md. Ibrahim et al., 2010). Sebatian antioksidan yang berbeza mempunyai kesan oksidatif yang berbeza. Kehadiran bahan lain selain sebatian fenolik seperti vitamin C, E dan karotenoid boleh mempengaruhi seluruh aktiviti antioksidan (Al-Mamary et al., 2002).

Ada juga kajian yang menunjukkan ketiadaan aktiviti antioksidan pada sesetengah madu. Berkemungkinan madu tersebut mengandungi jenis sebatian fenolik yang berbeza yang tidak menunjukkan sifat antioksidan (Al-Mamary et al., 2002).

Warna madu berkait rapat dengan kandungannya seperti mineral, debunga dan sebatian fenolik (Baltrusaityte et al., 2007). Terdapat juga laporan yang menunjukkan kaitan antara aktiviti antioksida dengan warna dan jumlah kandungan fenolik madu (Al-Mamary et al., 2002). Warna madu yang pelbagai menggambarkan kandungan pigmen dan ciri-ciri antioksida (karotenoid dan flavanoid) (Md. Ibrahim et al., 2010). *Colour intensity measure*, ABS_{450} , ditakrifkan sebagai keamatan warna 50% larutan madu (w/v) dan ia digunakan untuk menganggar taburan fitokimia (karotenoid, flavanoid) daripada keseluruhan kapasiti antioksida madu. Warna madu secara langsung menunjukkan nilai parameter ABS_{450} . Potensi antioksida bagi madu berkait rapat dengan kandungan fenolik dan flavanoid serta *colour intensity* (Md. Ibrahim et al., 2010).

3.3.2.5 Madu Tualang

Madu Tualang dikutip dari sarang lebah (*Apis sp.*) yang membina sarangnya di atas pokok Tualang (*Koompassia excelsa*) yang terdapat di dalam hutan di negeri Kedah (Tan et al., 2009) (Rajah 3.1). Di Malaysia, Madu Tualang biasanya digunakan dalam makanan dan sebagai produk kesihatan (Che Ghazali, 2009). Kajian menunjukkan bahawa Madu Tualang mempunyai ciri-ciri antimikrob, antiradang, antioksida, *antimutagenic*, antitumor, dan sifat-sifat antidiabetik, serta ciri penyembuhan luka (Sarfaz & Nor Hayati, 2013).



Rajah 3.1: Pokok Tualang (Mohd Sabran, 2013)



Rajah 3.2: Pegawai FAMA melihat proses penghasilan madu di Rumah Madu Tualang di Kuala Nerang, Kedah (Mohd Sabran, 2013).

Hasil kajian yang dilakukan oleh Kishore dan rakan-rakan (2011) menunjukkan Madu Tualang mempunyai jumlah kandungan fenolik yang paling tinggi berbanding dengan madu Gelam, madu *Indian forest* dan madu Nenas. Data yang didapati menunjukkan Madu Tualang mempunyai kesan antioksidan yang lebih baik bagi menentang spesies oksigen reaktif jika dibandingkan dengan ketiga-tiga madu lain yang

turut dikaji. Kandungan fenolik dan sebatian lain yang terdapat dalam madu menyumbang kepada pemusnahan radikal bebas dan aktiviti antioksida yang mendatangkan kesan positif kepada kesihatan manusia (Kishore et al., 2011).

Kajian yang dilakukan oleh Khalil dan rakan-rakan (2012) pula mengkaji jumlah kandungan polifenol dan flavonoid dan sifat antioksida dalam 11 sampel Madu Tualang. Sampel Madu Tualang (AgroMas®) telah dibekalkan oleh FAMA (Lembaga Pemasaran Pertanian Persekutuan, Kedah, Malaysia) yang dikumpul oleh pengumpul madu daripada 11 kawasan yang berlainan di Hutan Hujan di Kedah. Sampel Madu Tualang kemudian dibanding dengan madu tropika Borneo, yang merupakan satu lagi jenis madu yang terdapat di Malaysia. Hasil kajian menunjukkan bahawa secara purata, kandungan antioksida Madu Tualang, seperti jumlah kandungan polifenol dan flavonoid adalah lebih tinggi daripada madu tropika Borneo (Khalil et al., 2012).

Jumlah kandungan fenolik ditemui adalah lebih tinggi daripada flavonoid. Madu Tualang mempunyai keamatan warna dan sebatian fenolik yang mempunyai aktiviti antioksida yang baik, setanding dengan madu lain seperti madu Slovenia, *Herbhoney* dan madu Romania sebagaimana yang dilaporkan dalam kajian lepas (Mahaneem et al., 2010).

Kajian yang dilakukan oleh Ahmed dan Othman (2013) membandingkan ciri-ciri fizikokimia⁵ Madu Tualang dan madu Manuka sebagai penanda aras (Sarfarz & Nor Hayati, 2013). Madu Manuka adalah salah satu madu yang terkenal, dengan sumber nektar berasal daripada bunga Manuka (*Leptospermum scoparium*) yang banyak terdapat di seluruh New Zealand (Stephens, 2006). Madu Tualang mempunyai beberapa

⁵ Berkaitan dengan kedua-dua sifat fizik dan kimia.

ciri biokimia yang sama dengan madu Manuka dan juga mempunyai kandungan fenolik, flavonoid, dan HMF⁶ yang lebih tinggi berbanding dengan madu Manuka dan madu tempatan yang lain (Sarfarz & Nor Hayati, 2013). Jadual 4.3 menunjukkan perbandingan antara Madu Tualang dan madu Manuka.

Jadual 3.3: Ciri fisiokimia Madu Tualang dan madu Manuka (Sarfarz & Nor Hayati, 2013)

No.	Ciri fisiokima	Madu Tualang	Madu Manuka
1	Warna	Coklat gelap	Coklat cerah-gelap
2	pH	3.55 - 4.00	1.39
3	Kandungan lempbapan	23.30%	18.7%
4	Jumlah Reducing sugar	67.50%	76.0%
5	Fruktosa	29.60%	40.0%
6	Glukosa	30.00%	36.2%
7	Sukrosa	0.60%	2.8%
8	Maltosa	7.90%	1.2%
9	Potasium	0.51%	1.0%
10	Kalsium	0.18%	1.0%
11	Magnesium	0.11%	1.0%
12	Sodium	0.26%	0.0008%
13	Karbon	41.58%	-
14	Oksigen	57.67%	-

3.3.3 Memori dari Pespektif Islam

Dari perspektif Islam penyakit berkaitan kemerosotan kognitif ada diberikan penumpuan. Walau bagaimanapun, ianya lebih menjurus kepada penyakit yang sering kali melibatkan orang yang berusia, iaitu nyanyuk. Keadaan tersebut melibatkan terjejasnya memori seperti yang dinyatakan di dalam al-Qur'an, surah *al-Nahl* (16:70):

وَاللَّهُ خَلَقَكُمْ ثُمَّ يَتَوَفَّاكُمْ وَمِنْكُمْ مَنْ يُرَدُّ إِلَىٰ أَرْدَلِ الْعُمُرِ لَكُمْ لَا يَعْلَمُ بَعْدَ
عِلْمٍ شَيْئًا إِنَّ اللَّهَ عَلِيمٌ قَدِيرٌ ﴿٧٠﴾

⁶ *Hydroxymethylfurfural* (HMF) adalah produk penguraian fruktosa (salah satu gula utama dalam madu), ia membentuk perlahan-lahan semasa penyimpanan dan proses tersebut menjadi cepat apabila madu mengalami proses pemanasan

*“Allah menciptakanmu, kemudian mewafatkanmu; dan diantara kamu ada yang dikembalikan kepada **umur yang paling lemah (nyanyuk)**, supaya dia tidak mengetahui lagi sesuatu pun yang pernah diketahuinya. Sesungguhnya Allah Maha Mengetahui lagi Maha Kuasa”. (16): 70.*

Perkataan **أَرْدَل** yang terdapat dalam ayat tersebut menggambarkan kemerosotan deria serta kemampuan untuk bertutur dan berfikir yang tidak boleh dipulihkan, seperti yang sering berlaku kepada orang tua (Abu Hayyan, 1993). Tahap yang boleh dianggap tua dari perspektif Islam adalah 75 tahun, seperti yang disebut oleh Ali (r.a.). Antara ciri yang muncul adalah kekuatan berkurangan, nyanyuk dan kesukaran untuk mengingat. Pada umur ini, seseorang tidak dapat mengingat peristiwa lalu dan ilmu yang telah dipelajari (Isma'il, 1998).

Surah Yasin (36): 68 pula yang menceritakan tentang setiap kali umur bertambah, keadaan fizikal dan mental akan kembali kepada asal ketika masih kecil seperti keadaan fizikal yang kuat menjadi lemah dan yang bertenaga menjadi letih.

وَمَنْ نُّعَمِّرْهُ نُنَكِّسْهُ فِي الْخَلْقِ ۖ أَفَلَا يَعْقِلُونَ ﴿٦٨﴾

“Dan (hendaklah diingat bahawa) sesiapa yang Kami panjangkan umurnya, Kami balikkan kembali kejadiannya (kepada keadaan serba lemah; hakikat ini memang jelas) maka mengapa mereka tidak mahu memikirkannya?” (36): 68.

Surah Yusuf (12): 94-95 ada memperihalkan bagaimana Nabi Yaakub yang sudah tua dituduh nyanyuk/tidak siuman oleh anak-anak dan kaum kerabatnya. Ini dikira suatu fitnah kerana dalam pandangan Islam, semua Rasul adalah terpelihara dari

kemerosotan kognitif yang boleh menjejaskan tugas dakwah mereka (Al-Razi, 1990).

وَلَمَّا فَصَلَتِ الْعِيرُ قَالَ أَبُوهُمْ إِنِّي لَأَجِدُ رِيحَ يُوسُفَ ۚ لَوْلَا أَنْ تُفَنِّدُونِ
(٩٤) قَالُوا تَاللَّهِ إِنَّكَ لَفِي ضَلَالِكَ الْقَدِيمِ ﴿٩٥﴾

Dan semasa kafilah (mereka meninggalkan Mesir menuju ke tempat bapa mereka di Palestin), berkatalah bapa mereka (kepada kaum kerabatnya yang ada di sisinya): “Sesungguhnya aku ada terbau akan bau Yusuf. Jika kamu tidak menyangka aku sudah nyanyuk (tentulah kamu akan percaya)” (94) Mereka berkata: “Demi Allah! Sesungguhnya ayah masih berada dalam keadaan tidak siuman mu yang dahulu (95).”

Yusuf (12): 94-95.

Dalam hadith pula ada dinyatakan bahawa Rasulullah (s.a.w.) sering berdoa agar dijauhkan dari segala bencana termasuklah penyakit berkaitan memori iaitu nyanyuk. Ini menunjukkan Islam amat menganjurkan kaedah mencegah adalah lebih baik daripada merawat bukan sahaja melalui kaedah fizikal tetapi juga dari kaedah spiritual. Seperti yang diriwayatkan dari Anas (r.a.):

اللَّهُمَّ إِنِّي أَعُوذُ بِكَ مِنَ الْبُخْلِ وَالْكَسَلِ وَأَزْدَلِ الْعُمْرِ وَعَذَابِ الْقَبْرِ
وَفِتْنَةِ الْمَحْيَا وَالْمَمَاتِ

“Ya Allah aku berlindung dengan Engkau dari kebakhilan, kemalasan, umur yang tersia-sia (nyanyuk), dan dari siksa kubur serta fitnah dan mati”. (Muslim, t.t.).

3.3.4 Memori dari Perspektif Sains

Manusia dan haiwan memperoleh maklumat daripada pemerhatian terhadap kejadian yang berlaku di sekelilingnya dan disimpan di dalam otak sebagai ingatan/memori. Penekanan kajian mengenai kognitif, iaitu, kajian tentang proses dalaman yang menghasilkan maklumat dan bagaimana maklumat ini terbentuk adalah daya tumpuan, persepsi dan memori (Gordon, 1989) yang merupakan kategori fungsi kognitif asas. Fungsi kognitif tahap tinggi pula diklasifikasi kepada keupayaan memproses bahasa dan membuat keputusan (Glisky, 2007). Integrasi isyarat dari persekitaran yang berubah-ubah memerlukan proses kognitif yang kompleks. Proses ini melibatkan Memori Jangka Panjang (*Long Term Memory, LTM*) yang juga dikenali sebagai Memori Rujukan (*Reference Memory*) dan Memori Jangka Pendek (*Short Term Memory, STM*) yang juga dikenali sebagai Memori Kerja (*Working Memory*). Mereka menggunakan istilah Memori Kerja kerana memori jenis ini kekal aktif sehingga sesuatu tugas tersebut selesai (Gloria Bustos et al., 2003).

Walaupun ianya berkaitan dengan STM dari segi tempoh ingatan, memori kerja mewakili satu set struktur hipotesis dan proses yang lebih rumit yang memberi tumpuan lebih kepada manipulasi kandungan memori daripada pemeliharaan bagi tempoh tertentu. Walau bagaimanapun, Atkinson dan Shiffrin tidak menganggap STM sebagai bentuk penyimpanan yang sebenar, dan mencadangkan bahawa STM melibatkan proses kognitif bagi manipulasi maklumat. Oleh kerana itu, kadang-kadang istilah memori kerja digunakan apabila merujuk kepada STM (Nadel & Hardt, 2011).

Memori rujukan mewakili pengetahuan bagi aspek sesuatu tugas yang kekal antara ujian. Pada asalnya, istilah ini telah diperkenalkan untuk membezakan dua jenis pengetahuan tikus yang kekal dalam ujian *radial arm maze*, iaitu pengetahuan mengenai

lengan *maze* yang sentiasa mengandungi ganjaran makanan dalam setiap ujian (memori rujukan) dan memori untuk lengan yang sudah dilawati dalam mencari makanan dalam semasa ujian (memori kerja) (Nadel & Hardt, 2011).

3.3.4.1 Hipokampus dan Memori Spatial

Memori juga boleh diklasifikasikan mengikut maklumat yang terlibat. Contohnya memori spatial/ruang, memori episodik dan memori semantik. Memori spatial boleh didefinisikan sebagai fungsi untuk mengenalpasti, mengekod, menyimpan dan mengeluarkan semula maklumat yang disimpan tentang susunan objek atau laluan tertentu yang spesifik (Kessels et al., 2001). Ia adalah sebahagian daripada kognitif spatial yang merangkumi lingkungan gambaran mental berkaitan (persekitaran) dunia luar. Kesemua kebolehan kognitif berkaitan spatial digunakan untuk memanipulasi, mengingat semula dan mengemudi di antara ruang sama ada di dalam dunia sebenar atau imaginasi (Jacobs, 2003). Kawasan otak seperti hipokampus dan korteks hadapan, serta sistem peneuropancar kolinergik, adalah penting untuk menyelesaikan ujian RAM (Becker et al., 1980; Olton & Werz, 1978).

Memori spatial yang dianggap sebagai subjenis memori episodik mempunyai dua jenis memori spatial utama, iaitu (a) gambaran spatial tentang persekitaran lepas yang terperinci, dan (b) gambaran topografi berskema (O'Keefel & Nadel, 1978). Memori spatial melibatkan aspek memori *non-declarative* (prosedur), *non-declarative* (semantik dan episodik) serta STM dan LTM (Moscovitch et al., 2006). Memori episodik dan spatial melibatkan sistem yang neuroanatomi yang sama yang digunakan untuk pembelajaran spatial pada haiwan, iaitu hipokampus dan lain-lain kawasan temporal medial yang lain (Burgess et al., 2002).

Struktur otak yang terlibat dalam penghasilan memori adalah hipokampus (Kalat, 1992), iaitu struktur berpasangan, di sebelah kiri dan kanan otak. Struktur ini adalah sebahagian dari sistem limbik dan memainkan peranan penting dalam menukarkan STM kepada LTM. Hipokampus terletak di medial lobus temporal, iaitu di bawah permukaan korteks otak serebrum. Seperempat abad lalu, O'Keefe dan Nadel melaporkan pandangan mereka bahawa hipokampus merupakan bahagian otak yang memainkan peranan penting kepada memori spatial (Healy et al., 2005). Kajian eksperimen sebelumnya dengan jelas telah menunjukkan bahawa tikus boleh digunakan untuk mengkaji hubungan struktur/ fungsi antara bahagian otak yang dipilih dan pembelajaran atau memori (Wenk, 2004).

Pembedahan oleh Scoville dan Milner pada tahun 1950an untuk membuang hipokampus dan kawasan kortikal yang berkaitan untuk menghentikan epilepsi yang dihadapi pesakit H.M. menunjukkan bahawa otak, iaitu bahagian lobus temporal medial, adalah penting dalam pembentukan memori. Walaupun beliau mengalami amnesia yang teruk, H.M. masih memiliki kebolehan persepsi, kognitif dan bahasa yang normal. Beliau hanya tidak dapat membentuk memori baru (Good, 2002). Kajian ini menunjukkan hipokampus memainkan peranan penting terhadap memori spatial.

3.4 Analisis Perbandingan

Terdapat persamaan maklumat antara perspektif Islam dan sains mengenai madu dan memori. Ini dilihat dari aspek khasiat penggunaan madu, penghasilan madu, kandungan madu, memori dan struktur otak. Walau bagaimanapun, terdapat juga perbezaan maklumat antara perspektif Islam dan sains. Sebagai contoh, dinyatakan dalam kitab *Tibb Nabawi* bahawa antara ciri-ciri madu yang terbaik adalah madu yang putih warnanya. Tetapi, kajian saintifik menunjukkan madu yang berwarna gelap

mempunyai kandungan antioksidan yang lebih tinggi. Walau bagaimanapun, ini tidak bermakna madu yang berwarna terang mempunyai nilai nutrien yang rendah kerana setiap jenis madu mempunyai kandungan dan warna yang berbeza mengikut sumber nektar dan keadaan persekitaran. Oleh itu, warna madu bukanlah satu-satunya penentu kualiti madu selain kejernihan, kandungan air, rasa dan aroma madu.

Menurut Crane et al., (1984) seperti yang dipetik oleh Stefan Bogdanov et al., (2008), terdapat pelbagai jenis madu dengan rasa dan warna yang berbeza, bergantung kepada sumber botani. Madu yang mempunyai kandungan fruktosa yang tinggi (contohnya *acacia*) adalah lebih manis berbanding dengan madu yang mempunyai kepekatan glukosa yang tinggi (contohnya *rape*). Aroma madu bergantung kepada kuantiti dan jenis asid dan asid amino (Bogdanov et al., 2008).

Penggunaan madu amat digalakkan dalam Islam dengan gesaan utama adalah dalam ayat 68-69, surah *al-Nahl* yang menyatakan bahawa madu adalah penawar. Terdapat hadith dan tulisan cendekiawan Muslim juga memberi contoh-contoh mengenainya. Menurut Imam al-Syawkani, madu boleh menjadi ubat bagi penyakit tertentu apabila diminum begitu sahaja, iaitu tidak dicampur dengan bahan yang lain dan boleh menjadi ubat bagi banyak penyakit jika dicampurkan dengan adunan bahan yang lain (Zulkifli et al., 2011). Kajian saintifik memberi contoh-contoh khusus masalah kesihatan yang boleh dirawat melalui kajian eksperimen terhadap haiwan atau pun kajian klinikal.

Madu terbukti mempunyai kandungan yang bermanfaat seperti kandungan antioksidannya. Ayat 68-69 dalam surah *al-Nahl* menggambarkan penghasilan madu dan dikaitkan dengan makanan kesihatan.

Madu dikatakan mempunyai kesan positif ke atas memori dalam tradisi Islam dan terbukti secara saintifik mempunyai kesan positif terhadap fungsi kognitif, khususnya memori. Walau bagaimanapun, masih tidak banyak kajian saintifik mengenainya yang mengkaji jenis memori yang berbeza.

Rujukan dari kedua-dua perspektif juga menyatakan bahawa madu yang dihasilkan dalam pelbagai warna dari pelbagai sumber mempunyai hubungan dengan persekitaran ditempat nektar dikutip. Ayat 68-69 surah *al-Nahl*, menyatakan tentang wujudnya perbezaan madu yang dihasilkan oleh lebah. Penghasilan madu dalam pelbagai warna adalah berkaitan dengan kandungan pigmennya seperti karotenoids dan flavanoid yang memberi kesan kepada ciri antioksidasi madu. Kandungan antioksidasi madu dikatakan memberi kesan positif ke atas memori.

Koleksi ramuan untuk meningkatkan memori yang telah ditulis oleh cendekiawan Islam turut menggunakan bahan-bahan lain selain madu, seperti herba dan rempah yang terpilih. Ramuan tersebut diadun dan diproses untuk dijadikan makanan tambahan. Ramuan, sukatan, dos yang perlu diambil dan masa yang sesuai turut dinyatakan. Namun begitu, tidak ada laporan tentang klinikal keberkesanan ramuan yang digunakan. Sebahagian tumbuh-tumbuhan yang dikenalpasti dalam resepi tersebut berkemungkinan mempunyai aktiviti klinikal dan farmalogi dengan kesan sampingan. Ciri antioksidasi semulajadi yang tinggi dalam banyak tumbuhan adalah penyumbang yang penting kepada kualiti ubat herba (Carlsen et al., 2010). Kombinasi bahan yang berbeza selain madu perlu dinilai dengan lebih lanjut bagi mengetahui kesannya. Penyediaan dos dan cara pengambilan yang sesuai boleh memainkan peranan penting dalam memberikan kesan terapeutik kepada manusia.

Hasil analisis kebanyakan rempah dan herba mempunyai kandungan antioksidan yang amat tinggi. Walaupun rempah dan herba digunakan dalam kuantiti yang sedikit dalam hidangan seharian, ianya masih boleh menjadi penyumbang penting untuk pengambilan antioksidan, terutamanya dalam budaya pemakanan di mana rempah dan herba digunakan dengan kerap. Beberapa herba yang telah dikeringkan mempunyai kepekatan kandungan antioksidan yang tinggi berbanding dengan sampel segar. Ini adalah hasil daripada proses pengeringan yang meninggalkan kebanyakan antioksidan dalam herba tersebut. Oleh itu, herba kering dan buah-buahan berpotensi sebagai sumber antioksidan yang bagus. Ciri antioksidan semulajadi yang tinggi dalam banyak tumbuhan adalah penyumbang yang penting kepada kualiti ubat herba (Carlsen et al., 2010). Terdapat kajian yang menunjukkan diet yang mengandungi campuran herba memberikan kesan yang positif terhadap memori spatial (Ahn et al., 2015).

Banyak kajian epidemiologi dan klinikal yang mengaitkan pengambilan makanan yang kaya antioksidan dengan penurunan kes neurodegeneratif serta kadar kematian yang lebih rendah akibat penyakit kronik termasuk kencing manis, aterosklerosis, artritis reumatoid, penyakit jantung dan kanser. Kajian menunjukkan campuran makanan tambahan yang mengandungi antioksidan mendedahkan kesan sinergi dalam 92% kes. Pengambilan bahan campuran yang kaya dengan antioksidan mungkin memberikan beberapa manfaat tambahan (Almeida et al., 2011). Kajian yang dijalankan oleh Pandey dan Rizvi (2009) mendapati bahawa pengambilan buah-buahan dan sayuran yang kaya dengan antioksidan berkesan dalam mengurangkan kesan penuaan dan kelakuan (Pandey & Rizvi, 2009).

Keberkesanan antioksidasi tidak diketahui sepenuhnya. Begitu juga campuran yang terbaik bahan antioksidasi dan dos yang sesuai masih lagi dikaji. Contohnya, ujian yang dilakukan oleh Shailendra et al., (2012) menunjukkan campuran antioksidasi yang mengandungi vitamin C, vitamin E, selenium, dan methionine adalah munasabah sebagai salah satu komponen pengurusan perubatan bagi pankreatitis kronik. Walau bagaimanapun, dos dan tempoh terapi yang sesuai tidak dapat dikenalpasti. Lebih banyak kajian klinikal yang perlu dijalankan untuk menentukan kombinasi bahan, masa pengambilan, dan tempoh terapi yang sesuai bagi sesuatu rawatan (Chauhan et al., 2012). Oleh itu, berdasarkan kajian-kajian tersebut, dapat disimpulkan bahawa kombinasi madu dengan bahan lain dalam ramuan yang telah dinyatakan oleh sarjana Islam mungkin dapat memberikan kesan positif terhadap kesihatan terutamanya memori. Walau bagaimanapun penyediaan ubat dan dos yang sesuai memerlukan kajian yang lebih lanjut.

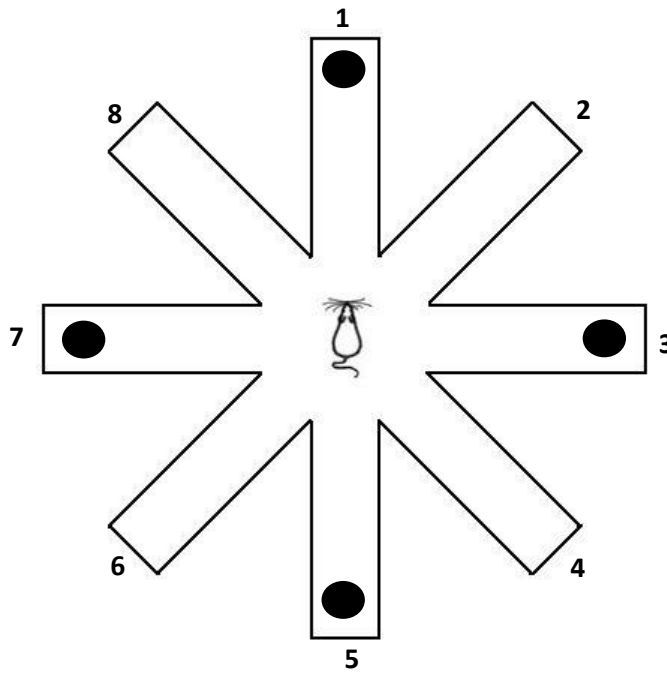
Maklumat dari kedua-dua perspektif menunjukkan pengambilan madu dapat memberikan kesan yang positif terhadap memori. Terdapat beberapa pendapat yang mencirikan jenis madu yang paling baik. Namun, apa yang penting adalah keaslian madu dan bebas dari sebarang pencemaran (seperti racun serangga dan spora) kerana sifat atau komposisi madu adalah pelbagai dan bergantung kepada sumber nektar. Beberapa jenis madu yang sumber nektarnya adalah dari tumbuhan yang mengandungi toksin seperti *Rhododendron ponticum* boleh memudaratkan (Bogdanov et al., 2008).

BAB 4: KOMPONEN KAJIAN HAIWAN: METODOLOGI

4.1 Kajian Kelakuan

4.1.1 Pengenalan

Kajian mengenai memori sering menggunakan model kelakuan sebagai kaedah penilaian. Ujian boleh dilakukan dengan menggunakan pelbagai jenis *maze* beserta ganjaran, contoh: makanan digunakan sebagai dorongan kepada haiwan eksperimen yang dilaparkan selama sehari. Eksperimen tentang memori spatial secara tradisinya melibatkan pemerhatian ke atas kelakuan tikus di dalam *radial arm maze* (RAM) dan eksperimen sebegini dipelopori oleh Olton (1976). Tikus yang lapar diletakkan di bahagian tengah yang dikelilingi lapan lengan dan tikus dibiarkan menjelajah ke semua lengan. Di hujung lengan tertentu diletakkan makanan yang berfungsi sebagai ganjaran (Gloria Bustos et al., 2003). Dijangka tikus membentuk memori tentang lengan yang mengandungi ganjaran dan mengingatinya apabila makanan telah dimakan. Jika tikus masuk semula ke lengan yang telah dilawati sebelumnya (sama ada yang mempunyai ganjaran mahupun tidak), ianya dikira sebagai kesilapan oleh memori kerja (Murphy et al., 2006). Rajah 4.1 menunjukkan tikus berada di tengah-tengah RAM yang mempunyai lapan lengan yang dilabel mengikut arah putaran jam dan asalnya tikus diletakkan mengarah ke lengan nombor 1. Di dalam contoh ini lengan nombor 1, 3, 5 dan 7 mempunyai makanan yang berfungsi sebagai ganjaran kepada tikus.



Rajah 4.1: *Radial-arm maze* (RAM) (Hanson, 2014)

Dalam kajian rintis yang dilakukan oleh Ismail (2010), tikus disuap-paksa madu dan larutan salin secara selama 56 hari. Tikus-tikus tersebut menjalani ujian memori yang melibatkan penggunaan RAM setiap lima hari. Hasil kajian menunjukkan tahap memori tikus yang mendapat madu tidak menunjukkan sebarang perbezaan yang signifikan berbanding dengan tikus yang mendapat larutan salin. Ini mungkin kerana tempoh pemberian madu dalam jangka masa yang pendek (akut) tidak memberikan kesan kepada memori tikus (Nabilah, 2010). Terdapat satu kajian menunjukkan pemberian madu dalam jangka masa yang panjang dapat meningkatkan memori spatial dan mengurangkan kerisauan pada tikus (Chepulis et al., 2009).

RAM telah terbukti menjadi sebagai salah satu alat yang sangat berguna untuk penilaian pembelajaran spatial dan memori pada haiwan roden. Asas RAM yang sedia ada sekarang telah dibangunkan oleh David Olton dan rakan-rakannya (Olton & Samuelson, 1976). RAM melibatkan kecenderungan semula jadi tikus untuk belajar dan

mengingati lokasi spatial yang berbeza untuk mencari makanan. Ia telah digunakan dalam pelbagai cara untuk menilai asas kelakuan untuk pembelajaran dan memori, kesan buruk bahan kimia toksik, dan kesan rawatan terapeutik yang baru (Levin, 2001). Prestasi kelakuan yang terbaik menunjukkan bilangan minimum kemasukan ke dalam lengan kosong atau masuk hanya sekali sahaja ke dalam lengan yang mempunyai ganjaran (Paul et al., 2009).

Versi RAM yang berbeza telah disesuaikan dengan menggunakan isyarat visual luaran atau “isyarat spatial”, di mana lokasi ganjaran dipadankan dengan isyarat luaran seperti kerusi, meja, dan orang. Versi lain yang dikenali sebagai *non-spatial RAM* dengan menggantikan isyarat visual luar dengan isyarat dalaman seperti isyarat aromatik yang berbeza bagi setiap lengan atau isyarat sentuhan (Paul et al., 2009).

Bilangan lengan boleh berbeza-beza daripada tiga sehingga 12 lengan. Bilangan yang paling lazim adalah lapan lengan. Terdapat juga pelbagai cara untuk menjalankan RAM untuk menilai pelbagai jenis maklumat mengenai fungsi kognitif. Seperti kebanyakan makmal lain, kajian ini menggunakan RAM buatan sendiri yang diperbuat daripada kayu kerana RAM yang dijual di pasaran adalah sangat mahal dan mungkin menghadapi kerosakan mekanikal semasa ujian.

4.1.2 Madu Tualang

Instrumen untuk kajian eksperimental yang utama adalah Madu Tualang asli (AgroMas). Ia dipilih untuk digunakan dalam kajian ini kerana ianya mudah didapati berbanding madu-madu asli tempatan yang lain. Madu Tualang asli (AgroMas) keluaran FAMA (Rajah 4.2) mewakili madu tempatan ini dibeli dari pembekal. Madu disimpan pada suhu bilik dan terlindung dari cahaya matahari secara langsung. Madu dengan kepekatan 70% telah disediakan dengan melarutkan 7ml Madu Tualang madu dengan 3ml larutan salin.



Rajah 4.2: Madu lebah Tualang (AgroMas)

4.1.3 Haiwan Eksperimen

Kajian melibatkan eksperimen kelakuan yang dilaksanakan di Rumah Haiwan Pusat Asasi Sains dan kerja neurohistologi di Makmal Histoteknik Institut Sains Biologi, Fakulti Sains, Universiti Malaya. Tikus *Sprague Dawley* jantan yang berumur 7-8 minggu diperolehi dari Unit Haiwan, Fakulti Perubatan. Tikus dibahagikan secara rawak menjadi dua kumpulan (Rajah 4.3). Tikus jantan (7-8 minggu) digunakan sebagai subjek eksperimen. Tikus ditempatkan berpasangan di dalam sangkar tikus (Rajah 4.4) dengan air dan *pelet* makanan diberikan secara *ad libitum* ke sangkar masing-masing. Eksperimen berkaitan memori dilakukan selama tiga bulan (12 minggu).



Rajah 4.3: Tikus dalam sangkar ditempatkan di Rumah Haiwan Pusat Asasi Sains, UM



Rajah 4.4: Tikus diletakkan berpasangan di dalam satu sangkar



Rajah 4.5: Pengambilan berat tikus

Sepanjang tempoh eksperimen ini, semua tikus akan ditimbang setiap tiga hari supaya 70% madu atau salin 1ml/100 gm berat badan dapat diberikan dalam jumlah berpatutan (Rajah 4.5). Berat badan tikus sepanjang eksperimen disertakan dalam Lampiran C. Namun, menjelang akhir eksperimen yang melibatkan tempoh yang lama, empat ekor tikus dari kumpulan madu telah mati dan menjadikan bilangan yang tinggal hanyalah lapan ekor. Madu adalah cecair yang likat yang menyukarkan aktiviti suap-paksa menyebabkan tikus berasa tidak selesa dan meronta berbeza dengan larutan salin yang lebih mudah diberi dalam tempoh yang singkat. Ini mungkin mencederakan salur penghadaman tikus seterusnya menyebabkan kematian.

Tikus diberi 70% madu (kumpulan rawatan) dan larutan salin (kumpulan kawalan) secara suap paksa (Rajah 4.6) menggunakan jarum khas (*gavage*, saiz 20G) (Rajah 4.7) pada hari pertama hingga hari ke-lima setiap minggu ($n=12$ ekor bagi setiap kumpulan). Tikus tersebut tidak diberi makan langsung pada hari ke-enam dan pada hari ke-tujuh ujian dijalankan. Tikus diberi makan semula seperti biasa pada hari ke-tujuh selepas ujian selesai dijalankan. Ini dilakukan selama 12 minggu. Protokol ini telah

diluluskan oleh *Ethics Committee for Animal Experimentation* (IACUC), Universiti Malaya [no. rujukan: ISB/20/04/2012/DSHA(R)].



Rajah 4.6: Suap-paksa

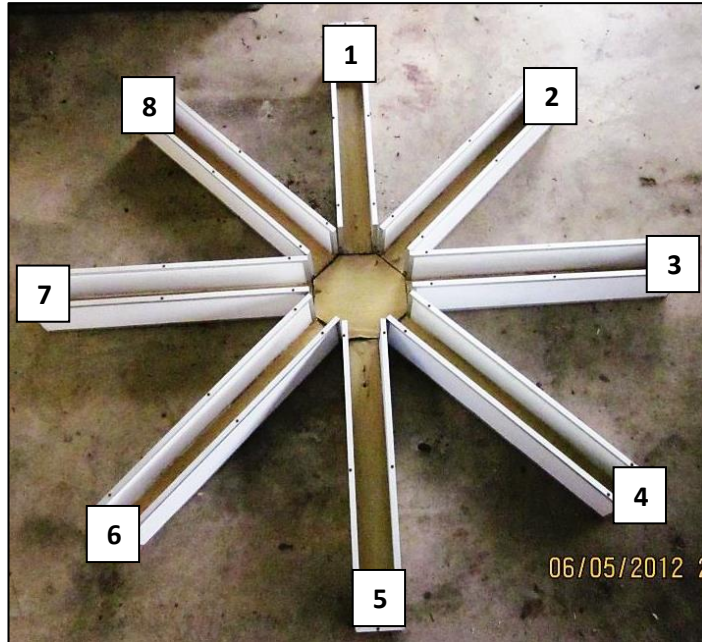


Rajah 4.7: Jarum suap-paksa

4.1.4 *Radial Arm Maze (RAM)*

Ujian kelakuan tikus berkaitan memori spatial dilakukan dengan menggunakan alatan ujian kelakuan, iaitu *Radial Arm Maze* (RAM). Ia mempunyai lapan lengan berukuran 70cm (panjang) x 10cm (lebar) x 15cm (tinggi) yang mengunjur dari platform tengah berbentuk oktagon yang keluasannya berukuran 25cm² (Rajah 4.8). Keseluruhan *maze* dicat dengan warna putih dan diletakkan pada kedudukan yang sama setiap kali ujian dilakukan. RAM ini diletak di dalam sebuah bilik yang dikelilingi oleh banyak isyarat visual (contohnya pengkaji, lampu, rak dan sinki), yang boleh digunakan oleh tikus untuk orientasi spatial. Lokasi isyarat ini tidak berubah sepanjang eksperimen dijalankan. RAM digunakan kerana ianya telah digunakan secara meluas

dalam kajian berkaitan spatial memori dan penggunaannya kurang melibatkan tekanan pada tikus seperti alat lain, contohnya *Moris Water Maze* (Paul et al., 2009).



Rajah 4.8: *Radial arm maze* (RAM) yang digunakan dalam kajian

4.1.5 Ujian Kelakuan

Ujian ini dijalankan seminggu sekali, iaitu pada hari ke-tujuh sepanjang tiga bulan eksperimen. Pada hari ke-lima, tikus diberi latihan dalam RAM dan tikus dilaparkan pada hari ke-enam untuk membuatkan tikus tersebut lebih bermotivasi mencari makanan ketika sesi ujian di hari ke-tujuh. Dijangka selepas beberapa sesi, haiwan dapat mempelajari dan membentuk memori spatial untuk mencari lengan yang betul, iaitu lengan yang masih mempunyai makanan (Tolman, 1984). Tempoh tiga bulan telah digunakan kerana menurut kajian rintis, tempoh kajian selama dua bulan adalah tidak cukup untuk mendapatkan kesan madu yang signifikan ke atas memori dan prestasi tikus, walaupun ia mempunyai pola kesan positif (Nabilah, 2010).

4.1.5.1 Fasa Penyesuaian

Sebelum memulakan eksperimen, adalah penting untuk membiasakan tikus-tikus dengan manusia, persekitaran dan alat eksperimen. Tikus diletakkan di dalam sangkar seminggu sebelum ujian dijalankan bagi membiasakan tikus dengan keadaan sekeliling di dalam rumah haiwan. Tikus juga dibiasakan dengan penyelidik dengan ia dipegang dua hingga lima kali untuk beberapa minit selama seminggu (Levin, 2001).

Makanan yang digunakan sebagai ganjaran, iaitu potongan coklat, turut diberikan kepada tikus di samping pelet dan minuman. Potongan coklat ini diberikan sekali sehari selama 2 hari, iaitu sebelum latihan dimulakan (Levin, 2001). Ini adalah untuk membiasakan tikus dengan ganjaran yang akan diletakkan di dalam *maze*.

4.1.5.2 Fasa Latihan

Latihan dijalankan selama tujuh hari fasa penyesuaian berlangsung. Potongan coklat diletakkan di dalam bekas di hujung lengan 1, 3, 5 dan 7 RAM. Sepasang tikus diletakkan di bahagian tengah dan dibiarkan menjelajah ke seluruh RAM selama tiga minit. Tikus diletakkan secara berpasangan untuk menjimatkan masa (Wenk, 2004). kerana jumlah tikus yang digunakan adalah banyak. Latihan ini adalah untuk memastikan tikus tidak mengalami tekanan atau takut apabila diletakkan ke dalam RAM nanti. Langkah ini juga dapat mengelakkan tikus teragak-agak dari menjelajah ke seluruh RAM dan seterusnya makan ganjaran yang diletakkan di hujung lengan RAM. Larutan alkohol 70% digunakan untuk mengelap RAM setiap kali selepas digunakan untuk sesi ujian setiap tikus untuk menyingkirkan bau najis dan kencing tikus yang boleh mengakibatkan gangguan terhadap keputusan.

4.1.5.3 Fasa Ujian

Ujian mingguan dijalankan pada hari ketujuh pada waktu sama, iaitu pada pukul 10 pagi. Sebelum tikus diletakkan di dalam RAM, ganjaran berupa potongan coklat diletakkan di dalam bekas di hujung lengan (1), (3), (5) dan (7). Tikus diletakkan di bahagian tengah dan dibiarkan menjelajah ke seluruh RAM selama tiga minit. Tikus dikira masuk ke dalam lengan RAM apabila keempat-empat tapak kakinya masuk ke dalam ambang (bahagian awal) lengan RAM. Tikus diletakkan menghadap ke arah lengan (1) setiap kali diletakkan di dalam RAM.

Data yang terkumpul dianalisis berdasarkan kekerapan dan peratusan menggunakan perisian SPSS. Data bagi kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan tikus direkod dan dianalisis seperti berikut (Shinomiya, et al., 2005): (a) Kemasukan pertama ke dalam lengan yang tidak mempunyai makanan dianggap sebagai kesalahan memori rujukan kerana tiada makanan pernah diletakkan di dalam lengan-lengan ini (lengan 2, 4, 6, 8). (b) Kemasukan semula ke dalam lengan yang asalnya mempunyai makanan, tetapi makanan telah pun dimakan dianggap sebagai kesalahan memori kerja. (c) Bilangan kemasukan pertama dan kemasukan semula ke dalam lengan yang tidak mempunyai makanan dikira sebagai kesalahan mutlak.

Analisis kuantitatif prestasi memori *spatial* tikus telah dibahagikan kepada tiga fasa dengan nilai purata setiap tiga minggu: Fasa 1 (minggu 1-3), Fasa 2 (minggu 4-6), Fasa 3 (minggu 7-9) dan Fasa 4 (minggu 10-12).

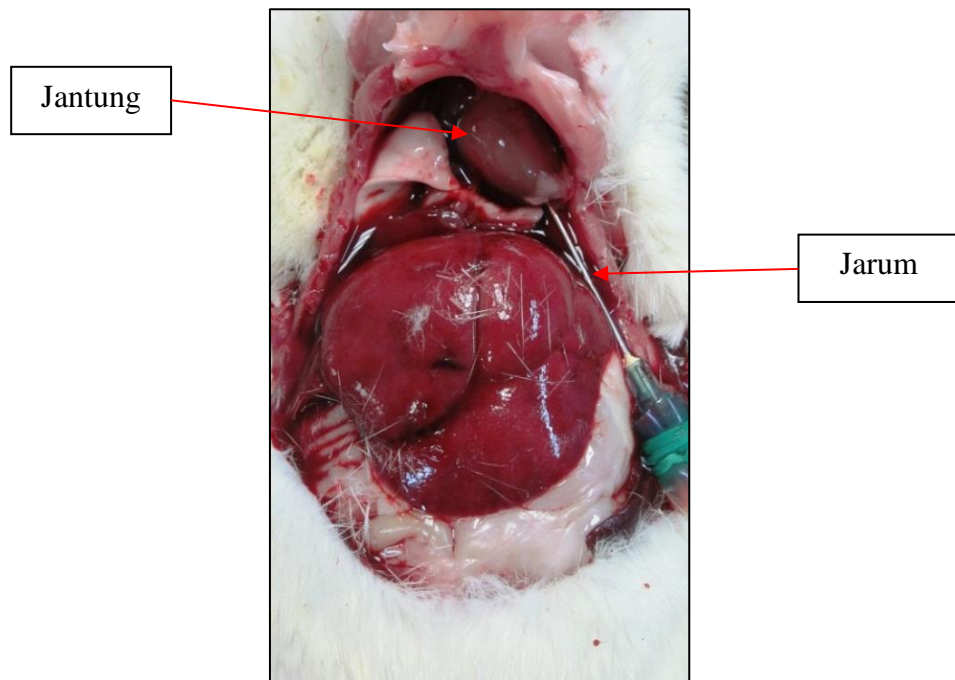
4.1.6 Analisis Statistik

Semua nilai dilaporkan sebagai *Mean*±*Standard Error Mean* (SEM). Ujian *Two way ANOVA (analysis of variance)* dilaksanakan dengan menggunakan perisian SPSS versi 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Nilai $p<0.05$ dianggap mewakili perbezaan statistik yang signifikan.

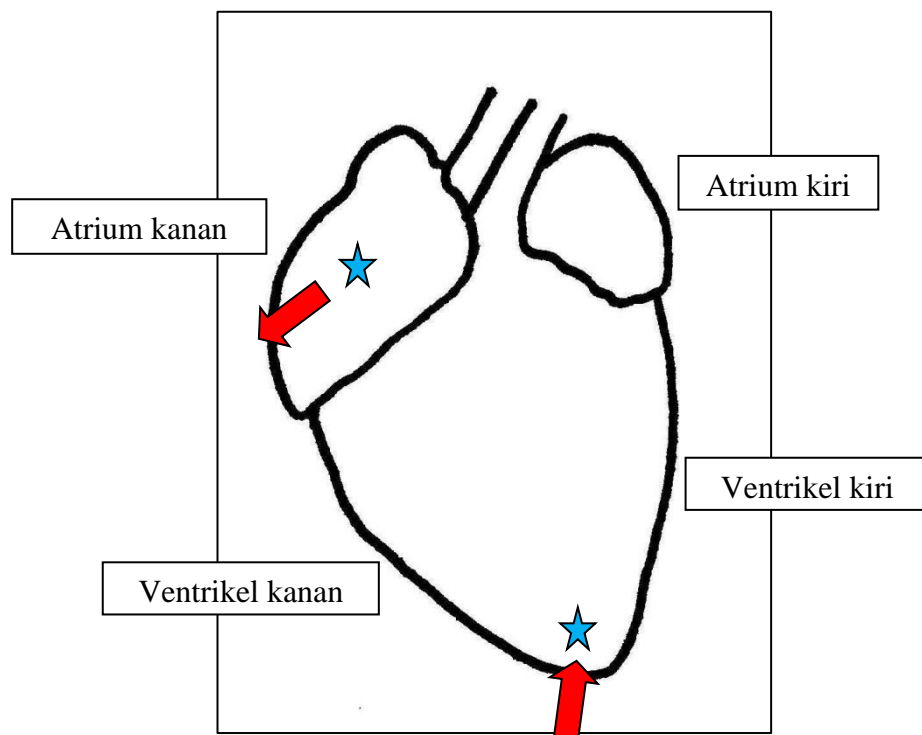
4.2 Morfologi Am Luaran Otak

Pengambilan Madu Tualang selama tiga bulan didapati memberi kesan terhadap fungsi otak. Walau bagaimanapun, sehingga kini masih tiada kajian yang dijalankan untuk melihat kesan pengambilan madu terhadap morfologi luaran otak. Oleh itu kajian ini dilakukan untuk turut melihat kesan madu terhadap morfologi luaran otak. Morfologi otak merangkumi morfologi luaran dan morfologi mikroskopi, iaitu histologi tisu otak.

Pada akhir keseluruhan kerja makmal eksperimen (1), tikus terlebih dahulu dibius dengan menggunakan dietil eter sebelum dikorbankan dengan kaedah perfusi intrakardiak (Rajah 4.9) menggunakan larutan 10% formalin sebagai pengawet. Kaedah perfusi intrakardiak menggunakan salur bekalan darah sebagai laluan larutan formalin yang dipam secara artifisial. Otak dibedah keluar serta ukurannya diambil untuk mendapatkan maklumat morfologi am luaran. Antara data yang akan diambil adalah berat, panjang dan lebar keseluruhan otak.

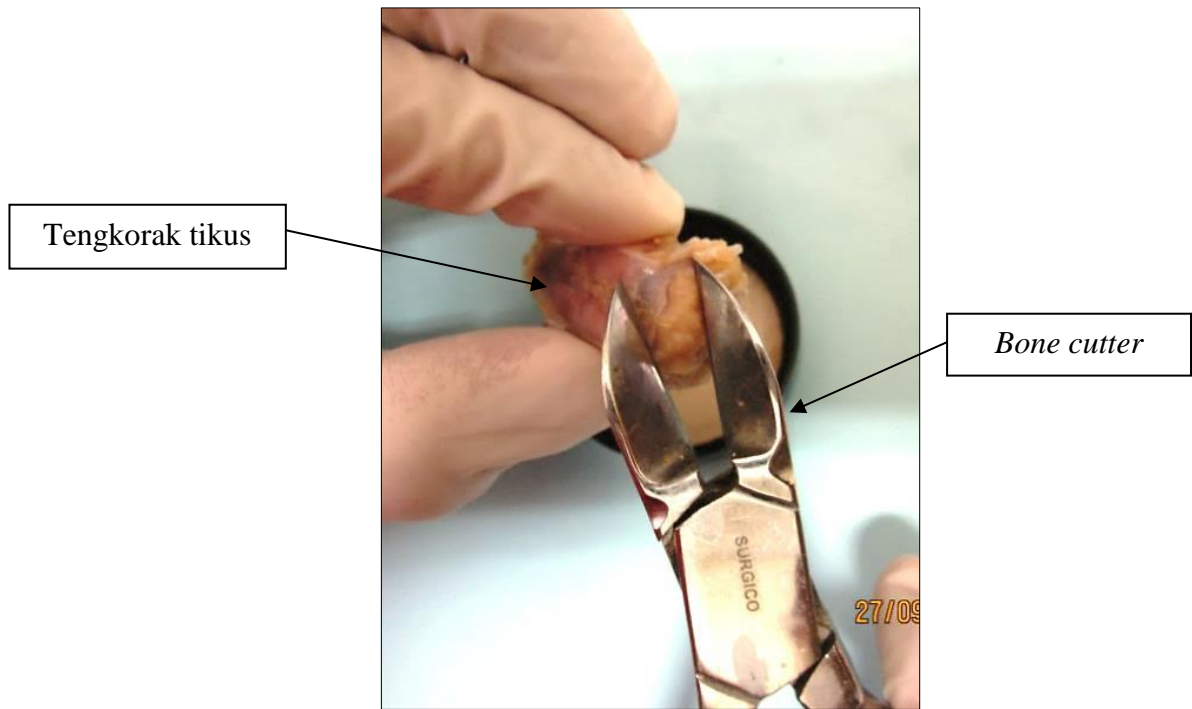


Rajah 4.9: Perfusi intrakardiak dengan larutan pengawet formalin 10%



Rajah 4.10: Rajah skematik perfusi intrakardiak jantung tikus

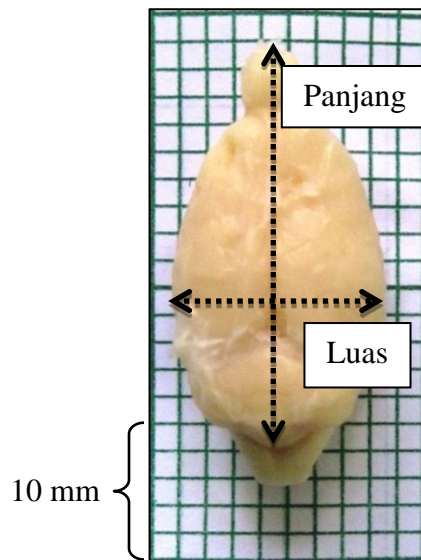
Proses pengawetan melalui perfusi intrakardial telah dijalankan untuk memastikan bahawa keseluruhan tisu otak tikus diawet sepenuhnya. Tikus yang telah dibius dibedah di bahagian ventral, iaitu bahagian perut untuk mendedahkan jantungnya. Lubang dibuat pada atrium kanan menggunakan gunting untuk mengalirkan darah keluar. Jarum perfusi dimasukkan ke dalam ventrikel kiri dengan segera (Rajah 4.10). Awalnya tikus dialiri dengan salin untuk menyingkirkan darah daripada sistem saluran darah dan diikuti dengan larutan 10% formalin. Jarum perfusi dipasang pada pam motor, yang mengalirkan cecair ke dalam badan tikus. Pergerakan sentakan pada otot tikus menunjukkan bahawa larutan pengawet telah sampai kepada bahagian-bahagian yang berbeza dalam badan dan ke kawasan tisu. Proses pengawetan dianggap selesai apabila badan tikus menjadi keras dan kaku. Otak tikus beserta tengkorak diasingkan dan direndam semalaman di dalam 10% formalin. Seterusnya otak yang dikeluarkan dari tengkorak menggunakan *bone cutter* (Rajah 4.11) disimpan di dalam 10% formalin untuk proses yang seterusnya (Rajah 4.12). Ukuran keseluruhan otak diambil seperti panjang dan lebar yang diukur di atas kertas graf (Rajah 4.13)



Rajah 4.11: Otak tikus dikeluarkan daripada tengkorak



Rajah 4.12: Otak tikus di dalam larutan formalin 10%



Rajah 4.13: Otak tikus

Setelah berat otak tikus ditimbang, lebar dan panjang otak tikus daripada kedua-dua kumpulan diukur menggunakan kertas graf. Ukuran lebar otak melibatkan ukuran bahagian yang paling lebar iaitu bahagian posterior serebrum, manakala ukuran panjang merangkumi bahagian rostral serebrum, iaitu hujung bebuli olfaktori hingga ke bahagian kaudal serebelum. Potongan di antara hujung serebelum dan bahagian anterior saraf tunjang dilakukan secara konsisten untuk memberikan ukuran panjang yang tepat.

4.3 Histologi Struktur Otak

4.3.1 Pengenalan

Hipokampus adalah sepasang struktur otak sub-korteks yang ditemui di kiri dan kanan lobus medial temporal. Hipokampus telah terbukti terlibat dalam pembentukan awal memori iaitu suatu aktiviti yang berkait rapat dengan proses pembelajaran. Ia dikira sebagai sebahagian sistem limbik.

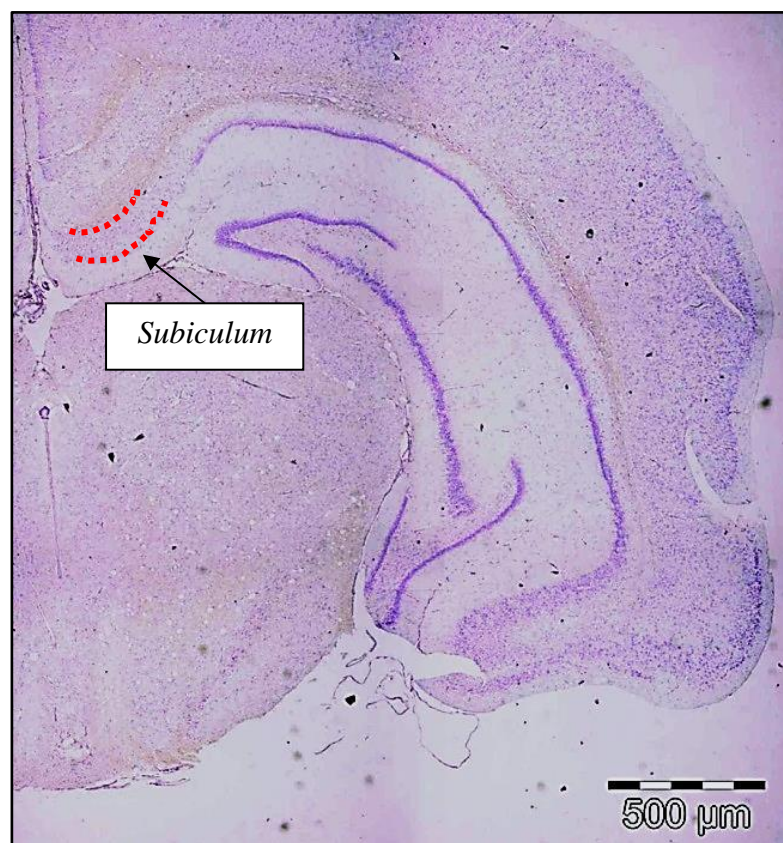
Kajian awal mengenai proses pembelajaran oleh tikus dilakukan oleh Tolman (1948) menunjukkan bahawa tikus mencipta dan menggunakan peta kognitif, iaitu gambaran global alam sekitar untuk mengenal pasti sasaran (ganjaran) di dalam *maze*. Ini seterusnya dikaitkan dengan hipokampus apabila kajian seterusnya oleh O'Keefe dan Dostrovsky (1971) mengenal pasti kepentingan komponen yang dikenali sebagai *place cell*. *Place cell* dalam hipokampus biasanya dilihat dengan menilai potensi tindakan ekstraselular yang direkodkan daripada sel utama dalam lapisan CA1 dan CA3 hipokampus pada tikus yang bergerak bebas (Eichenbaum et al., 1999).

Istilah hipokampus berasal dari perkataan Greek, iaitu *hippokampos*: “hippo” bermaksud kuda dan “kampos” bermaksud gergasi laut, yang merujuk kepada morfologinya. Menjelang pertengahan abad yang lalu sistem limbik yang terlibat dengan emosi khususnya hipokampus, menjadi salah satu struktur yang paling dikaji dalam sistem saraf. Ia telah dikaji melalui pendekatan pelbagai disiplin, di mana gabungan aspek anatomi, psikologi dan kelakuan telah digunakan (El Falougy & Benuska, 2006). Hipokampus adalah bahagian utama otak yang terlibat dalam memproses maklumat spatial (vertebrata) selain mengawal kelakuan berkaitan makanan dan selera makan (Tracy et al., 2001). Ia berbeza dalam saiz dan berkait rapat dengan keadaan persekitaran ekologi haiwan (Healy & Jozet-Alves, 2010).

Struktur hipokampus adalah struktur kompleks boleh dibahagikan kepada bahagian dorsal yang terletak di belakang septum, bahagian posterior di mana ia mula membengkok secara ventral dan lateral, dan bahagian ventral yang terletak di bahagian temporal otak (Rajah 5.6). Di *hippocampus proper*, di bahagian dorsal terdapat *fascia dentate* (*dentate gyrus*) tertanam di dalamnya. Fimbria adalah saluran gentian yang

besar terdapat di tepi sisi hipokampus yang terdedah dan struktur forniks dorsal pula terletak hampir kepada barisan pertengahan bawah korpus kalosum.

Istilah “*hippocampal formation*” (jasad hipokampus) merujuk kepada enam struktur khusus, iaitu *dentate gyrus*, *hippocampus proprius*, *subiculum proprium*, *presubiculum*, *parasubiculum* dan kawasan *entorhinalis* (El Falougy & Benuska, 2006). Tiga kawasan yang jelas adalah *dentate gyrus*, *hippocampus proprius* (juga dikenali sebagai tanduk Ammon atau *cornu ammonis*) dan *subiculum* (Rajah 4.13). Anatomi dan fungsi komponen seperti *dentate gyrus*, tanduk Ammon, kompleks *subicular*, dan kawasan *entorhinal cortex* adalah penting untuk prestasi memori kerja dan memori rujukan (Xavier et al., 1999).

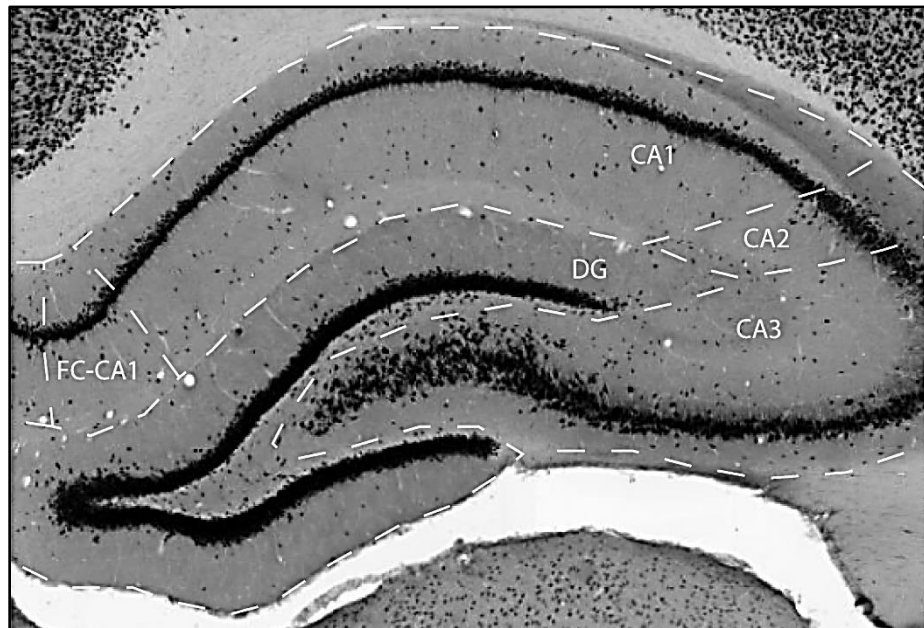


Rajah 4.13: *Subiculum* (20x)

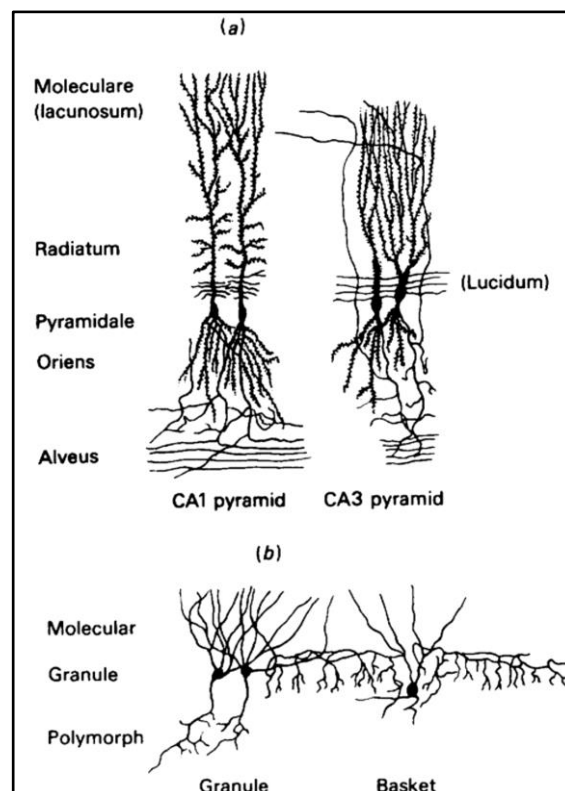
Hippocampus proper

Hippocampus proper terdiri daripada neuron-neuron yang tersusun sebagai lapisan tertentu seperti ditunjukkan dalam Rajah 4.14. Ia dibahagikan kepada beberapa bahagian mengikut ketebalan lapisan, saiz sel dan kepadatan sel (Xavier et al., 1999). Empat lapisan mengikut saiz ketumpatan dan cabang akson dan dendrit sel piramid, adalah lapisan CA1, CA2, CA3 dan CA4 (Rajah 4.14). *Subiculum* adalah kawasan peralihan di antara sub-bahagian CA1 dan korteks entorhinal yang berdekatan (El Falougy et al., 2008). Neuron yang utama di dalam hipokampus dan *subiculum* adalah sel piramid. Penjanaan sel piramid hipokampus selesai sebelum proses kelahiran. Neuron sel piramid menjalani proses kematangan dan perkembangan pada sambungan akson dan dendrit selepas dilahirkan (El Falougy et al., 2008).

Dentate gyrus (DG) adalah sebahagian kecil daripada hipokampus yang penting dalam fungsi kognitif seperti pembelajaran dan memori (Tashiro et al., 2007). DG adalah struktur yang bergelung dengan bahagian lekuk yang terbuka mengarah ke *hippocampus proprius* (El Falougy et al., 2008). DG terdiri daripada tiga lapisan iaitu lapisan molekul, lapisan sel granular dan hilus yang juga dikenali sebagai lapisan polimorfik. Sel granular adalah sel asas di dalam DG. Ianya tersusun padat dan membentuk lapisan sel granular berbentuk V di dalam DG tikus (Rajah 4.14) (Hala et al., 2010).



Rajah 4.14: Keratan rentas kawasan *hippocampus proprius* (Rat Hippocampus Atlas, 2011)



Rajah 4.15: Jenis sel neuron dalam hipokampus (O'Keefe & Nadel, 1978)

Neuron piramid mempunyai dendrit apikal dan basal, manakala neuron granul hanya mempunyai dendrit apikal (Rajah 4.15). Neuron *basket* berbeza daripada sel-sel piramid dan granul, dan ini dilihat paling jelas di dalam CA3. Berbeza dengan piramid, sel-sel *basket* tidak mempunyai ciri berduri pada dendrit apikal dan tidak berada dalam hubungan dengan input gentian. Di samping itu, sel-sel *basket* tidak menghantar akson keluar dari kawasan CA3, manakala sel-sel piramid menghantar aksonnya keluar.

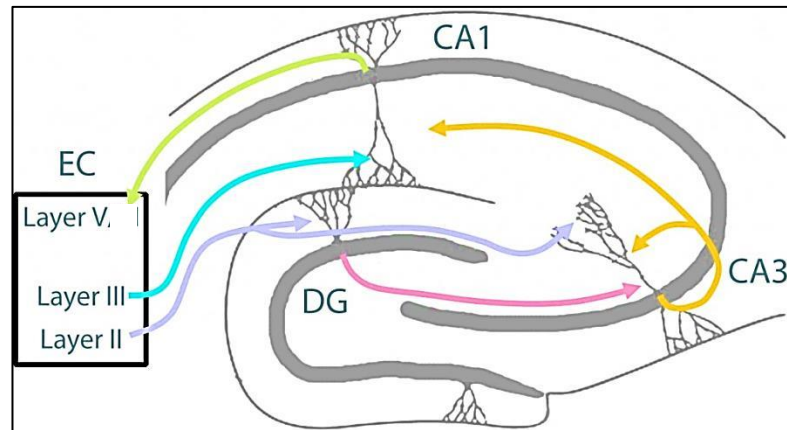
Neuron piramid boleh dibahagikan kepada beberapa domain berfungsi. Dendrit menerima kebanyakan rangsangan dan rencatan input sinaptik sel dan mengintegrasikan mereka. Badan sel menggabungkan input daripada dendrit dan menerima hanya sinaps GABAergic manakala segmen awal akson adalah tapak permulaan tindakan potensi dan juga hanya menerima input *GABAergic* sahaja. Akson ini tidak mempunyai sinaps dan memancarkan output daripada neuron ke sasaran tanpa pengubahsuaian selanjutnya (Szilágyi et al., 2011).

Litar hipokampus

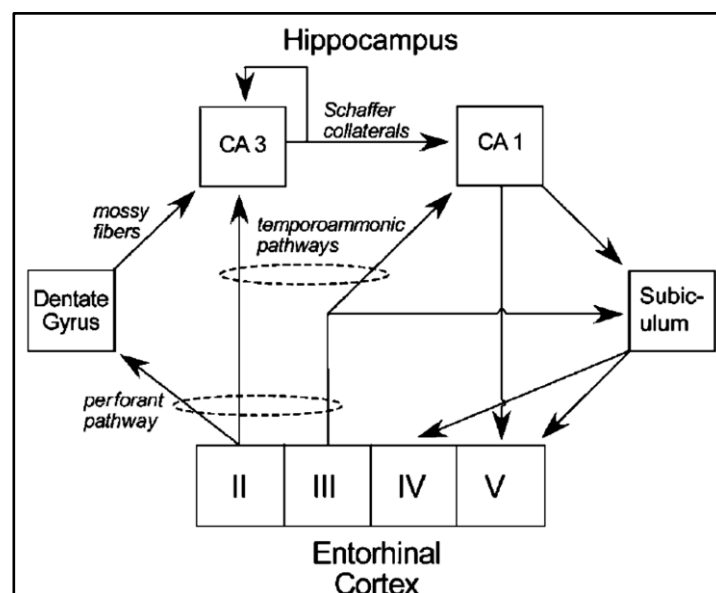
Maklumat yang diterima dari deria penglihatan, pendengaran mula-mula dihantar ke kawasan parahipokampus korteks, kemudian melalui *entorhinal cortex* dan seterusnya dihantar ke *hippocampus proper*. Maklumat tersebut melalui beberapa kawasan yang berbeza di dalam hipokampus sebelum ke korteks untuk deria.

Komponen utama pembentukan hipokampus dihubungkan dengan tiga litar iaitu (a) litar *trisynaptic* (*entorhinal cortex* - *dentate gyrus* - CA3 - CA1), (b) litar *disynaptic* (*entorhinal cortex* - CA3 - CA1), dan (c) litar *monosynaptic* (*entorhinal cortex* - CA1) (Xavier et al., 1999).

Pusat utama bagi penghantaran maklumat deria ke hipokampus adalah *entorhinal cortex* (Rajah 4.16 dan 4.17). Lapisan II *entorhinal cortex* menyediakan input utama kepada hipokampus dengan menghantar input tersebut kepada *dentate gyrus* laluan *Perforant*, yang seterusnya menghantar input utama kepada lapisan CA3 melalui unjuran *mossy fiber*. Terdapat juga unjuran satu arah yang lebih kecil kepada lapisan CA3 dari lapisan II *entorhinal cortex*. CA3 kemudian menghantar input kepada lapisan CA1 melalui laluan *Schaffer*/ laluan komisur, tetapi ada unjuran yang kembali ke lapisan CA3. Lapisan CA1 juga menerima unjuran *temporoammonic* secara terus dari lapisan III *entorhinal cortex* seperti *subiculum*. Lapisan CA1 kemudian menghantar maklumat kepada *subiculum* dan juga menghantar maklumat kepada *entorhinal cortex* lapisan V. *Subiculum* menghantar maklumat yang diproses (output) kepada *entorhinal cortex* lapisan IV dan V (Martin & Clark, 2007). Oleh itu, akson neuron dalam lapisan CA1 mengunjur kepada neuron di *subiculum* dan *entorhinal cortex*. Bahagian hipokampus yang menerima maklumat adalah *dentate gyrus*, manakala bahagian menghantar maklumat (output) dari hipokampus adalah *subiculum*. Akson neuron sel piramid di *subiculum* mengunjur ke nukleus subkortikal melalui fimbria, iaitu satu saluran nipis jisim putih di dalam hipokampus. Akhir sekali, maklumat ini kembali kepada kawasan kortikal deria, iaitu kawasan ia dihantar masuk sebelum ia diproses oleh hipokampus.



Rajah 4.16: Gambaran keratan rentas yang menerangkan litar hipokampus-*entorhinal cortex* yang ditunjukkan dengan anak panah (Diba, 2012).

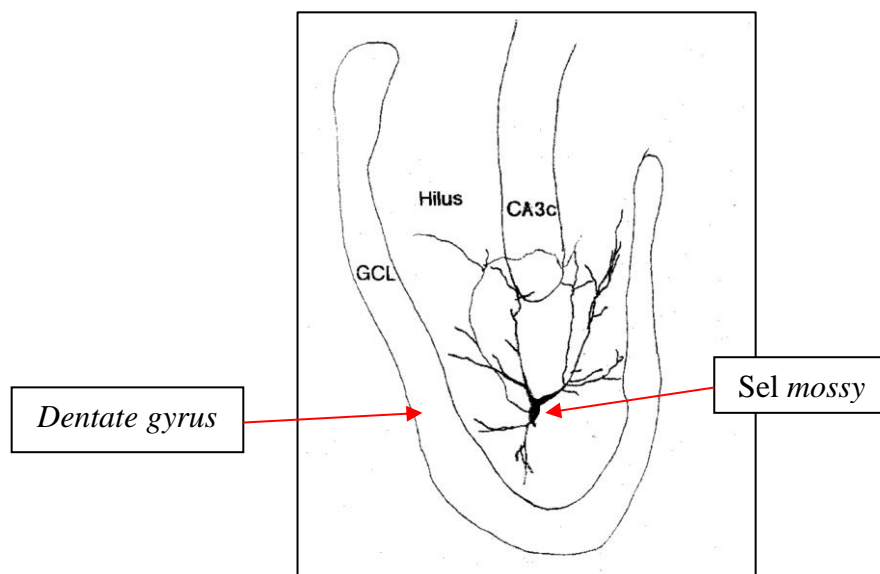


Rajah 4.17: Litar hipokampus (Martin & Clark, 2007).

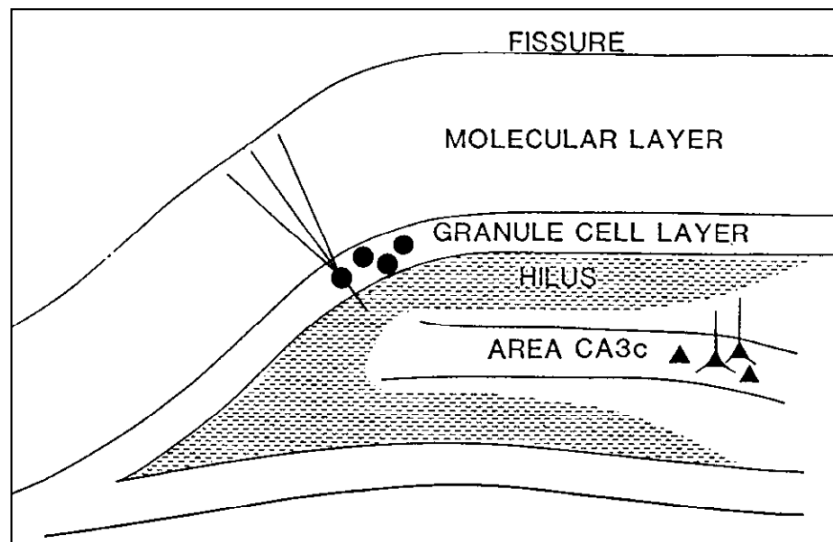
Sebagai mana yang dipetik oleh Scharfman dan Myers (2013), Amaral (1978) mentakrifkan hilus sebagai kawasan khusus di antara kedua-dua lapisan sel granul. Hilus mengelilingi kawasan lapisan sel CA3c serta dendrit sel piramid CA3c. Se lain sel *mossy* (Rajah 4.18), adalah sukar untuk mengenalpasti neuron lain di dalam kawasan hilus di dalam hipokampus tikus. Ini adalah kerana kawasan CA3c merangkumi

keseluruhan ruang antara lapisan sel granul, iaitu kawasan yang kecil sahaja di antara lapisan sel granul (Rajah 4.19) (Scharfman & Myers, 2013).

Walaupun hilus mengandungi pelbagai jenis sel, sel utamanya adalah sel *mossy* (Rajah 4.18). Ia menerima input rangsangan daripada sel granul *dentate gyrus* dan mengunjur kembali kepada sel granul dan interneurons dalam *dentate gyrus*. Sistem *dentate gyrus*-hilus mampu memproses maklumat yang kompleks (Minai & Best, 1998). Terdapat kajian menunjukkan bahawa beberapa laluan dalam sistem *dentate gyrus*-hilus mungkin menyokong *Long-term potentiation* (LTP), iaitu pemprosesan pembentukan memori. Laluan output korteks *entorhinal*, yang dikenali sebagai laluan *perforant*, mengunjur kepada beberapa kawasan hipokampus *proper*, termasuk *dentate gyrus*, CA3, dan hilus (Hetherington et al., 1994).



Rajah 4.18: Sel *mossy* yang menghubungkan *dentate gyrus* dan CA3c (The Strowbridgen Lab, 2013)



Rajah 4.19: Kawasan lapisan sel granul, hilus dan CA3c (Scharfman, 1991).

Long-term potentiation (LTP) dan long term depression (LTD)

Pada tahun 1986, Richard Morris mengemukakan beberapa bukti awal bahawa *Long-term potentiation* (LTP) adalah penting bagi pembentukan memori *in vivo* (Morris et al., 1986). LTP pada penghantaran sinaps dalam hipokampus adalah model utama eksperimen untuk mengkaji asas pembelajaran dan memori dalam vertebrata (Bliss & Collingridge, 1993). Penyimpanan memori melibatkan modulasi yang berterusan dari sambungan sinaptik di antara neuron. Sinaps boleh diubah suai dalam pelbagai cara dan pengubahan kekuatan sinaptik biasanya adalah dalam bentuk LTP atau *long term depression* (LTD) pada sinaps yang aktif (Klur, 2006).

Proses hipokampus dan memori melibatkan tindak balas hipokampus terhadap rangsangan yang berulang-ulang dengan sinaps menerima input dari persekitaran. Peningkatan dalam pelepasan peneuropancar menyebabkan potensi sinaptik sel hipokampus meningkat (Restak, 1984). Ini berlaku melalui LTP, iaitu peningkatan pada keberkesanan sinaps yang menerima rangsangan yang berulang-ulang. Dengan substrat molekulnya merupakan oleh reseptor glutamat NMDA yang terdapat banyak di dalam

hipokampus. Penyahkutuban berulang pada membran pos sinaps menyebabkan pengubahsuaian dalam reseptor NMDA seterusnya membolehkan kalsium untuk memasuki sel. Ini menyebabkan pengaktifan protein kinase, dan pemfosforilan reseptor AMPA glutamat yang seterusnya menyebabkan pengukuhan pada sinaps (Briar et al., 2003). Reseptor yang terlibat dalam pembelajaran spatial ialah reseptor NMDA. LTP tidak terlibat dalam semua bentuk pembelajaran (Morris et al., 1986), tetapi LTD pula adalah pengurangan kesan yang kekal pada sinaps yang berlaku pada beberapa jenis stimulasi elektrik dalam hipokampus. Ia juga merupakan satu proses di mana proses LTP dibalikkan di dalam hipokampus dan neokorteks (Bear dan Malenka, 1994). Terdapat dua jenis LTD, iaitu *heterosynaptic LTD* dan *homosynaptic LTD*. *Heterosynaptic LTD* berlaku pada sinaps yang tidak aktif, semasa rangsangan berfrekuensi tinggi pada sinaps. Manakala, *homosynaptic LTD* pula berlaku pada sinaps yang diaktifkan, pada frekuensi rendah (Bear & Abraham, 1996).

4.3.2 Histologi

Histologi adalah penting untuk memahami morfologi tisu dan mengaitkan struktur dengan fungsi (Young, 2006). Ia boleh dianggap sebagai kajian anatomi mikroskopik, kerana ia bukan sahaja merangkumi struktur mikroskopik tisu, tetapi turut merangkumi sel, organ dan sistem organ (Gartner & Hiatt, 2001). Bagi tujuan pemeriksaan tisu di bawah mikroskop, prosedur histologi yang baik adalah sangat penting untuk mendapatkan hasil yang memuaskan. Formalin 10% telah dipilih sebagai larutan pengawet dan *cresyl violet* digunakan sebagai pewarna untuk teknik perwarnaan *Nissl* dalam kajian ini.

4.3.3 Pewarnaan *Nissl*

Kaedah pewarnaan neurohistologi digunakan untuk kajian peringkat tisu, untuk membolehkan perbandingan antara struktur hipokampus tikus yang diberikan rawatan dan tikus kawalan. Struktur hipokampus dikaitkan dengan memori. Teknik pewarnaan *Nissl* mewarnakan struktur yang dikenali sebagai *Nissl bodies* yang terdapat di dalam soma neuron. *Nissl bodies* merupakan organel-organel seperti ribosom, retikulum endoplasma dan lain-lain. Penamaan teknik adalah sempena ahli histologi Franz Nissl yang mencipta teknik pewarnaan ini untuk mengenal pasti soma sel neuron di tisu otak (Beaudet & Rambourg, 1983).

4.3.4 Proses Pewarnaan Slaid

Prosedur pewarnaan melibatkan proses mencelupkan keratan otak yang dilekapkan pada slaid kaca secara berurutan ke dalam beberapa larutan yang berbeza mengikut masa yang telah ditetapkan (Jones, 1996). Sebelum itu, beberapa langkah seperti berikut perlu dilaksanakan, bermula dengan tisu yang telah diawetkan.

4.3.4.1 Dehidrasi

Proses dijalankan untuk menyingkirkan air daripada sampel tisu dengan memindahkan spesimen ke dalam turutan larutan alkohol. Tempoh proses dehidrasi adalah sama bagi setiap tisu yang diproses. Setiap tisu direndam di dalam larutan alkohol 70% selama 2 jam. Selepas itu, ianya dipindahkan ke dalam larutan alkohol 85% selama 2 jam. Selepas itu, ianya dipindahkan ke dalam larutan alkohol 95% dua kali selama 2 jam setiap satu. Akhir sekali, ia dipindahkan ke dalam alkohol tulen dua kali selama 2 jam setiap satu. Proses ini dilakukan larutan alkohol bersiri dilakukan bagi mengelak tisu dari mengalami kejutan akibat penurunan kandungan air secara

mendadak. Larutan alkohol 70%, 95% and 100% dibeli dari pembekal, manakala larutan alkohol 85% dinyatakan di dalam makmal. Penyediaan alkohol 85% disertakan di dalam Lampiran A.

4.3.4.2 Penjernihan (*Clearing*)

Proses melibatkan proses penyingkiran baki alkohol di dalam tisu dengan menggunakan toluena sebagai agen penjernih. Tisu didapati mengecut menjadi lebih kecil dari saiz sebenar. Tisu diletakkan di dalam toluena dua kali selama dua jam setiap satu. Selepas ditukar ke dalam toluena selama dua jam, sampel tisu dipindahkan ke dalam campuran toluena dan parafin (1:1) selama dua jam di dalam ketuhar.

4.3.4.3 Infiltrasi

Proses infiltrasi adalah proses penyerapan bahan penyokong, iaitu lilin parafin ke dalam rongga tisu dan sel. Untuk memastikan parafin meresap sepenuhnya ke dalam sampel tisu, rendaman ke dalam tiga siri parafin yang dicairkan di dalam ketuhar (Rajah 4.20) pada suhu 60°C selama dua jam setiap satu telah dilakukan.



Rajah 4.20: Ketuhar

4.3.4.4 Benaman tisu

Bagi memudahkan proses pengeratan, tisu dibenam di dalam medium lilin parafin, iaitu medium benaman yang sesuai bagi mikroskop cahaya (Gartner & Hiatt, 2001).

Tisu tersebut disusun ke dalam acuan yang telah diisi dengan parafin dari *wax dispenser* (Rajah 4.21). Label diletakkan pada bahagian muka blok sebagai menandakan bahagian yang perlu dimulakan semasa proses pengeratan tisu (Rajah 4.22). Blok tersebut dibiarkan mengeras dengan merendamkannya di dalam air untuk semalaman. Setelah blok tersebut mengeras, ianya dikeluarkan daripada acuan dan dipotong menjadi blok yang lebih kecil untuk proses pengeratan tisu.



Rajah 4.21: *Wax dispenser*



Rajah 4.22: Tisu otak dalam bahan benaman parafin

4.3.4.5 Pengeratan tisu

Blok sampel tisu yang telah dipotong kepada bentuk yang lebih kecil kemudiannya dikerat dengan menggunakan mikrotom (ketebalan $8\mu\text{m}$) menjadi susunan keratan seperti reben yang panjang (Rajah 4.23). Proses pengeratan tisu adalah proses

yang rumit kerana ia melibatkan ketelitian dan skil lebih-lebih lagi apabila melibatkan organ yang besar seperti otak. Ia perlu dilakukan dengan berhati-hati bagi mengelakkan keratan reben tisu daripada terkoyak.



Rajah 4.23: Pengeratan tisu otak menggunakan mikrotom

4.3.4.6 Pelekatan keratan (*Mounting*)

Keratan reben yang terpilih diletakkan di atas slaid kaca untuk langkah yang seterusnya. Ianya diletakkan menggunakan skapel di atas slaid kaca yang telah dibasahkan dengan air suling terlebih dahulu. Medium albumin Mayer digunakan untuk membantu pelekatan. Seterusnya slaid kaca dengan keratan tisu diletakkan atas alat pemanas slaid untuk mengembangkan reben tersebut (Rajah 4.24). Slaid diperiksa dari masa ke semasa bagi mengelakkan tisu dari kering. Setelah reben tersebut telah mengembang, slaid dikeringkan semalaman di dalam ketuhar pada suhu 40-45°C.



Rajah 4.24: Alat pemanas slaid

4.3.4.7 Pewarnaan

Teknik pewarnaan yang digunakan dalam kajian ini ialah teknik pewarnaan *Nissl* yang mewarnakan soma neuron dengan menggunakan *cresyl violet* sebagai pewarna. Pada awalnya penyah-parafin keratan tisu dilakukan dengan mencelup slaid kaca dengan keratan ke dalam xilena sebanyak dua kali, selama tiga minit setiap satu. Seterusnya proses hidrasi dengan merendamkan slaid ke dalam larutan alkohol 95% sebanyak dua kali diikuti larutan alkohol 70% selama tiga minit setiap satu. Slaid kemudian dibilas dengan air suling selama tiga minit.

Rendaman dalam *cresyl violet* selama 20 minit seterusnya dilakukan dan diikuti dengan larutan alkohol 70% dengan bilasan yang cepat. Seterusnya diikuti oleh proses dehidrasi dalam tiga siri *tertiary butyl alcohol* (TBA) selama tiga minit setiap satu. Akhir sekali proses penjernihan di dalam siri xilena sebanyak dua kali, selama tiga minit atau lebih setiap satu. Teknik pewarnaan ini menyebabkan soma sel neuron berwarna biru. Bahagian yang diwarnakan adalah *Nissl bodies*, iaitu organel-organel seperti endoplasmik retikulum dan pewarnaan ini memberi gambaran tompokan pada soma neuron. Proses pewarnaan ini dilakukan di dalam kebuk wasap (Rajah 4.25).

Larutan *cresyl violet* sebaliknya digunakan sebanyak dua kali sahaja selepas ia dibuat.

Penyediaan larutan *cresyl violet* dinyatakan dalam Lampiran A.



Rajah 4.25: Pewarnaan *Nissl* dilakukan di dalam kebuk wasap

4.3.4.8 Penutupan slaid (*Coverslipping*)

Keratan pada slaid kaca yang telah diwarnakan akhirnya mesti ditutup dengan slip penutup untuk melindunginya daripada persekitaran dan dapat bertahan lebih lama.

DPX (Distrene-80) adalah medium yang membantu proses ini.

DPX dititiskan di atas slip penutup yang secara perlahan-lahan dilekapkan ke atas slaid, bermula dengan bahagian hujung slaid. DPX dibiarkan meresap perlahan-lahan ke seluruh slaid untuk mengelakkan buih udara daripada terperangkap di bawah slip penutup. Akhirnya, slaid dikeringkan di dalam ketuhar semalaman pada suhu 30°C (Rajah 4.26).



Rajah 4.26: Slaid yang sudah diproses

4.3.4.9 Pemerhatian dan Analisis Slaid

Slaid yang sudah siap diproses seterusnya dianalisis menggunakan mikroskop cahaya pada kuasa pembesaran 4×, 10×, 20× dan 40×. Gambar slaid ditangkap dan dianalisis melalui perisian *Analyzer Life Science Software* yang dipasang pada komputer dan disambung pada mikroskop cahaya (Rajah 4.27). Pemerhatian difokuskan kepada tisu hipokampus.

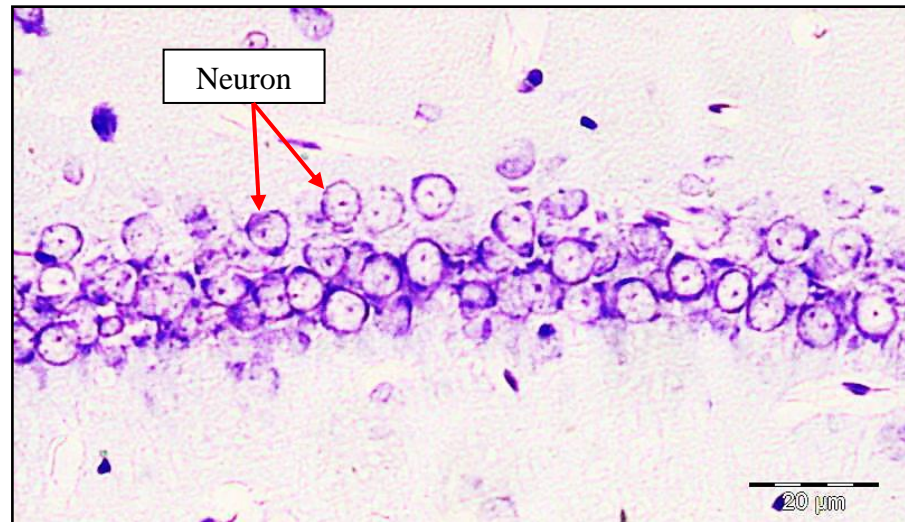
Hanya bahagian dari hipokampus dorsal sahaja diambil kira dalam kajian ini, (Rajah 4.28). Pengiraan sel dilakukan dengan slaid yang diamati pada pembesaran 200x. Soma neuron dikira dalam kawasan seluas $358.8 \times 266.34 \mu\text{m}^2$. Pengiraan sel melibatkan tiga kawasan, iaitu lapisan sel piramid CA1, CA3a dan CA3c/hilus. Hanya soma neuron dengan nukleus dan nukleolus yang jelas sahaja dikira.



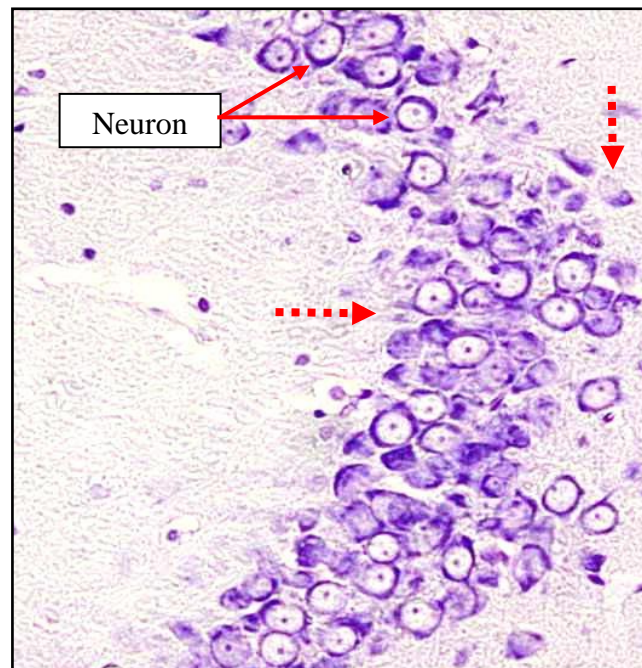
Rajah 4.27: Mikroskop cahaya (Olympus BX51), Jerman



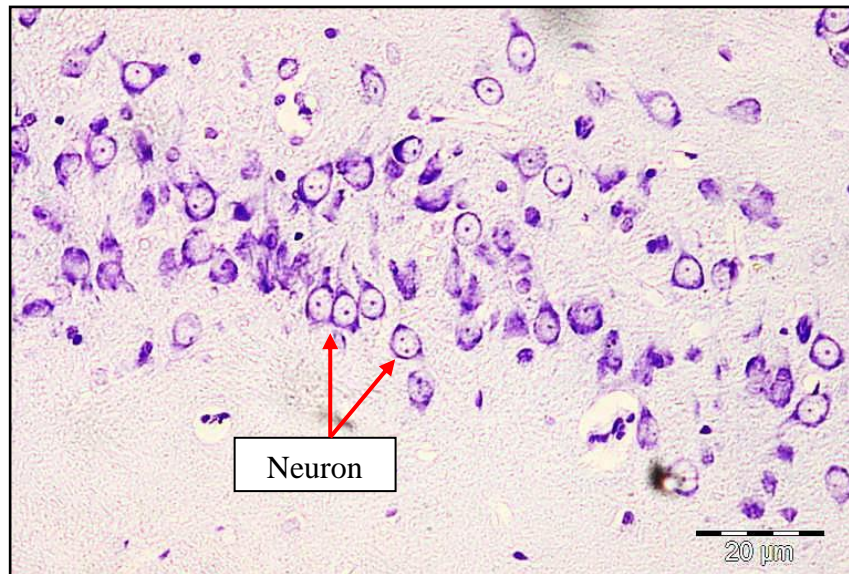
Rajah 4.28: Keratan rentas bahagian dorsal struktur hipokampus (20x)



Rajah 4.30: Lapisan neuron piramid CA1 (400x)



Rajah 4.31: Lapisan neuron piramid CA3 (400x)



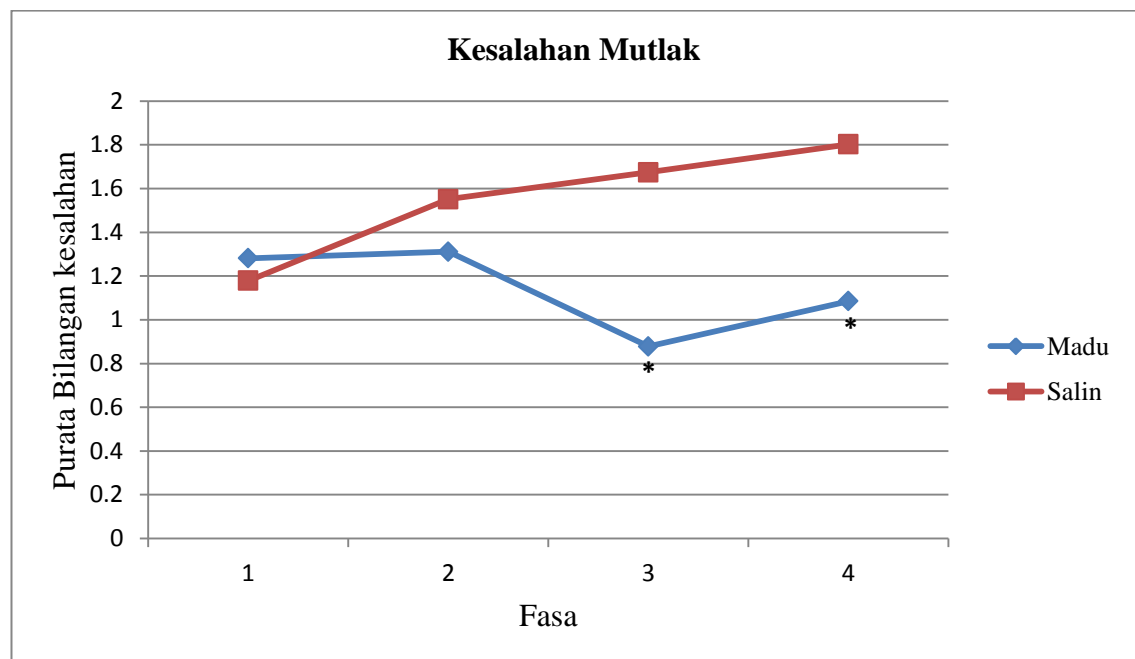
Rajah 4.32: Neuron piramid CA3 di kawasan hilus (400x)

Pengiraan sel dilakukan secara manual menggunakan mikroskop (Olympus BX51, Jerman), dengan bantuan perisian *Analyzer Life Science Software*. Bagi setiap haiwan, kedua-dua hemisfera kanan dan kiri tiga slaid yang berbeza telah dikira untuk memberikan sebanyak lima slaid bagi setiap haiwan. Dalam eksperimen ini sebanyak enam ekor tikus dipilih secara rawak dari setiap kumpulan, iaitu kumpulan rawatan dan kumpulan kawalan. Perbandingan antara kumpulan dinilai dengan menggunakan *Two way ANOVA*. Data dinyatakan sebagai $\text{min} \pm \text{SEM}$. Nilai $p < 0.05$ dianggap sebagai perbezaan yang signifikan (Lladó-Pelfort et al., 2012).

BAB 5: KOMPONEN KAJIAN HAIWAN: KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

5.1 Kajian kelakuan

Penilaian prestasi memori tikus dinilai berdasarkan bilangan kesalahan yang dilakukan oleh tikus semasa ujian dijalankan. Parameter yang diambil kira adalah kesalahan mutlak, kesalahan memori rujukan dan kesalahan memori kerja.



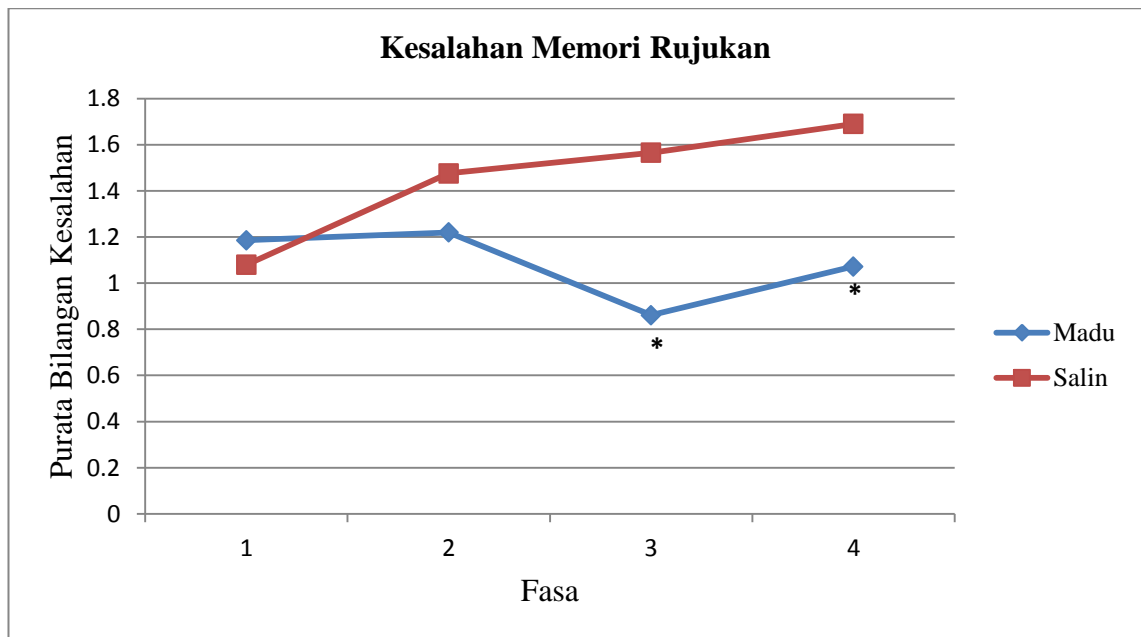
Rajah 5.1: Perbandingan kumpulan madu berbanding kumpulan salin (Kesalahan Mutlak). * $p < 0.05$ berbanding dengan kumpulan kawalan (salin)

Jadual 5.1: Purata $\text{Min} \pm \text{SEM}$ bilangan kemasukan pertama dan kemasukan semula ke dalam lengan yang tidak mempunyai ganjaran (Kesalahan Mutlak).

Kumpulan	Fasa 1 (minggu 1-3)	Fasa 2 (minggu 4-6)	Fasa 3 (minggu 7-9)	Fasa 4 (minggu 10-12)
Madu	1.281 ± 0.121^a	1.311 ± 0.121^a	0.878 ± 0.121^a	1.085 ± 0.121^a
Salin	1.179 ± 0.099^a	1.551 ± 0.099^a	1.674 ± 0.009^b	1.802 ± 0.009^b

Nilai $p < 0.05$ dianggap signifikan. Min dengan superskrip yang berbeza (a, b) dalam baris yang sama dianggap mempunyai perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$).

Rajah 5.1 dan Jadual 5.1 menunjukkan jumlah kesalahan mutlak yang dilakukan oleh kumpulan madu dan salin melibatkan bilangan kemasukan pertama dan kemasukan semula ke dalam lengan yang tidak mempunyai ganjaran. Purata kemasukan semula kumpulan madu mengikut fasa adalah 1.281 ± 0.121 (Fasa 1), 1.311 ± 0.121 (Fasa 2), 0.878 ± 0.121 (Fasa 3) dan 1.085 ± 0.121 (Fasa 4). Manakala, purata kemasukan semula kumpulan salin mengikut fasa adalah 1.179 ± 0.099 (Fasa 1), 1.551 ± 0.009 (Fasa 2), 1.674 ± 0.009 (Fasa 3) dan 1.802 ± 0.009 (Fasa 4). Bermula pada fasa ketiga dan keempat, kumpulan madu menunjukkan pengurangan yang signifikan dalam jumlah kesalahan berbanding dengan kumpulan salin.



Rajah 5.2: Kesalahan memori rujukan (kemasukan pertama ke dalam lengan yang tidak mempunyai ganjaran). * $p < 0.05$ berbanding dengan kumpulan kawalan (salin)

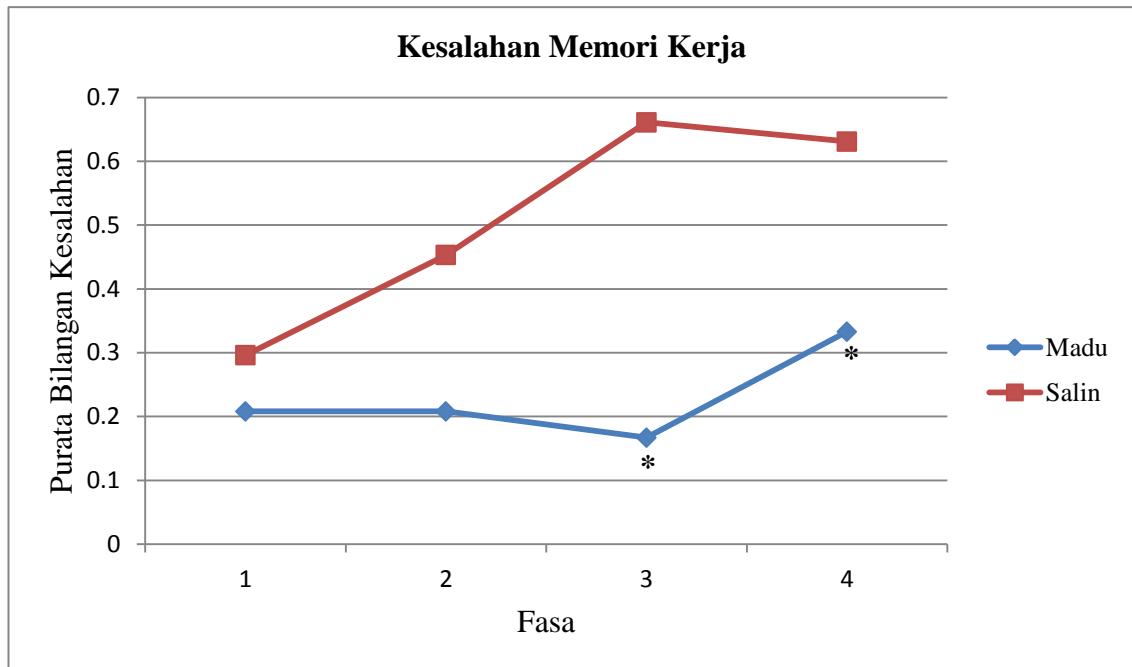
Jadual 5.2: Purata Min \pm SEM bilangan kemasukan pertama ke dalam lengan yang tidak mempunyai ganjaran (Kesalahan Memori Rujukan).

Kumpulan	Fasa 1 (minggu 1-3)	Fasa 2 (minggu 4-6)	Fasa 3 (minggu 7-9)	Fasa 4 (minggu 10-12)
Madu	1.186 \pm 0.108 ^a	1.220 \pm 0.108 ^a	0.861 \pm 0.108 ^a	1.072 \pm 0.108 ^a
Salin	1.080 \pm 0.088 ^a	1.476 \pm 0.088 ^a	1.565 \pm 0.088 ^b	1.690 \pm 0.088 ^b

Nilai $p < 0.05$ dianggap signifikan. Min dengan superskrip yang berbeza (a, b) dalam baris yang sama dianggap mempunyai perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$).

Rajah 5.2 dan Jadual 5.2 menunjukkan jumlah prestasi tikus dari kedua-dua kumpulan bagi kemasukan ke dalam lengan yang tidak mempunyai ganjaran. Purata kemasukan semula kumpulan madu mengikut fasa adalah 1.186 \pm 0.108 (Fasa 1), 1.220 \pm 0.108 (Fasa 2), 0.861 \pm 0.108 (Fasa 3) dan 1.072 \pm 0.108 (Fasa 4). Manakala, purata kemasukan semula kumpulan salin mengikut fasa adalah 1.080 \pm 0.088 (Fasa 1), 1.476 \pm 0.088 (Fasa 2), 1.565 \pm 0.088 (Fasa 3) dan 1.690 \pm 0.088 (Fasa 4). Bermula pada

fasa ketiga dan keempat, kumpulan madu menunjukkan pengurangan yang signifikan dalam kesalahan memori rujukan.



Rajah 5.3: Kesalahan memori kerja (kemasukan semula ke dalam lengan yang mempunyai ganjaran). * $p < 0.05$ berbanding dengan kumpulan kawalan (salin)

Jadual 5.3: Purata Min \pm SEM bilangan kemasukan semula ke dalam lengan yang mempunyai ganjaran (Kesalahan Memori Kerja).

Kumpulan	Fasa 1 (minggu 1-3)	Fasa 2 (minggu 4-6)	Fasa 3 (minggu 7-9)	Fasa 4 (minggu 10-12)
Madu	0.208 \pm 0.107 ^a	0.208 \pm 0.107 ^a	0.167 \pm 0.107 ^a	0.333 \pm 0.107 ^a
Salin	0.296 \pm 0.088 ^a	0.453 \pm 0.088 ^a	0.661 \pm 0.088 ^b	0.631 \pm 0.088 ^b

Nilai $p < 0.05$ dianggap signifikan. Min dengan superskrip yang berbeza (a, b) dalam baris yang sama dianggap mempunyai perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$)

Rajah 5.3 dan Jadual 5.3 menunjukkan jumlah prestasi tikus dari kedua-dua kumpulan bagi kemasukan semula ke dalam lengan yang mempunyai ganjaran. Purata kemasukan semula kumpulan madu mengikut fasa adalah 0.208 ± 0.107 (Fasa 1), 0.208 ± 0.107 (Fasa 2), 0.167 ± 0.107 (Fasa 3) dan 0.333 ± 0.107 (Fasa 4). Manakala, purata kemasukan semula kumpulan salin mengikut fasa adalah 0.296 ± 0.088 (Fasa 1), 0.453 ± 0.088 (Fasa 2), 0.661 ± 0.088 (Fasa 3) dan 0.631 ± 0.088 (Fasa 4). Bermula pada fasa ketiga dan keempat, kumpulan madu menunjukkan pengurangan dalam kesalahan memori kerja.

Ujian statistik menggunakan ujian *Two way* ANOVA, menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) pada kesalahan mutlak, kesalahan memori rujukan dan kesalahan memori kerja bermula dari fasa ketiga dan keempat. Kesemua keputusan ujian statistik ANOVA disertakan di dalam Lampiran C.

Secara umumnya, kumpulan madu menunjukkan penurunan yang signifikan dalam kesalahan mutlak, kesalahan memori rujukan, dan kesalahan memori kerja berbanding dengan kumpulan salin dalam tempoh dua fasa terakhir ($p < 0.05$). Dapatan kajian mencadangkan bahawa madu secara signifikan meningkatkan pembelajaran dan/atau memori selepas enam minggu penggunaannya. Kesan ini dilihat kekal sehingga tempoh 12 minggu penggunaan iaitu sepanjang tempoh eksperimen. Purata bilangan kesalahan memori kerja yang kurang berbanding dengan purata bilangan kesalahan memori rujukan menunjukkan bahawa Madu Tualang menunjukkan kesan positif dalam meningkatkan memori kerja berbanding dengan memori rujukan. Dalam kajian ini, separuh lengan diletakkan makanan (empat lengan daripada lapan lengan) untuk menilai prestasi memori spatial tikus. Ini membolehkan penilaian terhadap

memori kerja (memori jangka pendek) dan memori rujukan (memori jangka panjang) tikus dilakukan pada masa yang sama (Tarragon et al., 2012).

Ketika ujian RAM, tikus dianggap dapat mengingat lengan yang telah dilawati dan/atau lengan yang tidak mempunyai makanan. Pengurangan kemasukan semula berhubungkait secara langsung dengan isyarat persekitaran yang ada dan tempoh tinjauan (Mazmanian & Roberts, 1983). Olton dan Collison (1979) berpendapat bahawa ketika di dalam RAM tikus biasanya bergantung kepada isyarat persekitaran untuk menyelesaikan masalah dan tidak menggunakan strategi tindak balas. Apabila tikus menggunakan isyarat diluar RAM/ekstra-RAM untuk mengenalpasti lengan yang mana mempunyai makanan di dalam RAM, ianya menunjukkan prestasi yang hampir sempurna. Manakala, isyarat dari dalam RAM/intra-RAM (contohnya bau) tidak mendorong tikus untuk menunjukkan prestasi yang lebih baik. Terdapat banyak kajian yang menunjukkan isyarat ekstra-RAM lebih banyak digunakan berbanding isyarat intra-RAM oleh tikus di dalam kajian menggunakan RAM (Olton & Collison, 1979). Dalam kajian ini, RAM diletakkan pada kedudukan yang sama dan ujian dilakukan pada masa yang sama bagi setiap tikus. RAM dilap dengan alkohol 70% untuk menyingkirkan isyarat bau dan seterusnya memastikan tikus menggunakan isyarat spatial untuk mencari lengan yang betul mempunyai makanan. Kedudukan objek dan perabot seperti sinki dan rak di dalam bilik ujian juga dikekalkan sepanjang eksperimen dijalankan. Kajian kebelakangan ini melaporkan bahawa pelbagai strategi bukan berkaitan memori turut digunakan, termasuk isyarat motor algoritma dan diskriminasi bau. Walau bagaimanapun, kesemua tikus dari kedua-dua kumpulan dalam kajian ini menjalani protokol yang sama. Oleh itu, prestasi memori tikus dari kedua-dua kumpulan dapat dikenalpasti.

Keberkesanan madu dalam meningkatkan memori dipengaruhi beberapa faktor, iaitu kandungan glukosa dan aktiviti antioksidan dalam madu. Secara fisiologi, karbohidrat ditukar menjadi glukosa, iaitu sumber tenaga utama bagi otak. Oleh itu, glukosa dalam madu berfungsi sebagai sumber tenaga. Kajian yang dilakukan Korol & Gold (1998) ke atas sekumpulan pelajar kolej mendapati pengambilan glukosa meningkatkan memori. Glukosa juga memainkan peranan untuk meningkatkan proses mengingat dalam kalangan pelajar-pelajar tersebut. Kajian awal menunjukkan bahawa glukosa atau sesuatu metabolit mungkin mengaktifkan pelepasan peneuropancar asetilkolin pada tikus ketika ia terlibat dalam proses pembelajaran (Korol & Gold, 1998). Sepanjang proses pembelajaran yang melibatkan memori spatial, kadar pelepasan asetilkolin dalam hipokampus tikus (struktur yang berperanan dalam pembelajaran dan ingatan) adalah lebih tinggi berbanding dengan asetikolin yang dilepaskan ketika tikus berehat di dalam sangkar (Ragozzino et al., 1996). Walau bagaimanapun, kadar glukosa darah yang tinggi melemahkan prestasi memori (Riby et al., 2009).

Kajian menunjukkan kandungan antioksidan dalam madu berkeupayaan mengurangkan kerisauan dan meningkatkan memori spatial tikus (Chepulis et al., 2009). Kajian klinikal menunjukkan pengambilan antioksidan dapat meningkatkan prestasi fungsi kognitif, termasuk bagi yang berumur (Grodstein et al., 2003) dan dikaitkan dengan skor memori yang lebih baik (Chepulis et al., 2009).

Bahan-bahan yang kaya dengan antioksidan seperti vitamin E, idevenone, *Bacopa monniera*, *Ginkgo biloba*, ginseng, bioflavonoids dan pelbagai *radical scavengers* bebas atau antioksidan yang lain didapati berkesan dalam mengurangkan

amnesia atau meningkatkan fungsi kognitif di dalam haiwan dan manusia (Kishore & Singh, 2005).

Madu menunjukkan julat aktiviti antioksidan yang luas bergantung kepada sumber nektar tumbuhan (Mahaneem et al., 2010). Kesan antioksidan yang ditunjukkan oleh madu adalah disebabkan elemen seperti flavanoid, asid fenolik, asid askorbik, katalase, peroksida, karotenoid dan hasil tindak balas *Maillard* (Bogdanov et al., 2008). Madu Tualang mempunyai keamatan warna yang baik dan juga mengandungi sebatian fenolik yang mempunyai aktiviti antioksidan yang baik, setanding dengan pelbagai jenis madu luar yang lain seperti madu Slovenia (contohnya madu *Chestnut*, *Fir*, *Spruce*, *Multifloral* dan *Forest*), madu Romania (contohnya madu *Acacia*, *Lime*, *Sunflower*, *Chestnut* dan *Honeydew*) (Mahaneem et al., 2010). Beberapa kajian dijalankan untuk mengetahui dos yang sesuai perlu diberikan untuk mendatangkan kesan kepada memori dan fungsi kognitif (Kesse-Guyot et al., 2011; Cho et al., 2003).

Kajian mengenai dos madu yang sesuai diperlukan untuk memberikan kesan positif kepada memori masih belum lagi ditetapkan. Ini mungkin kerana tidak banyak kajian yang dilakukan berkaitan madu dan memori. Dalam kajian yang dijalankan oleh Chepulis et al., (2009), tikus yang diberi 10% madu menunjukkan prestasi memori spatial yang lebih baik pada bulan ke sembilan dan ke-12 berbanding dengan tikus yang diberikan diet sukrosa atau diet bebas gula (Chepulis et al., 2009). Ini berbeza dengan hasil dapatan kajian ini yang menunjukkan tikus yang diberi dos 70% madu kurang melakukan kesalahan memori hanya selepas enam minggu penggunaan dos tinggi. Kajian yang dijalankan oleh Bogdanov et al., (2008) menunjukkan madu mempunyai pelbagai kesan yang baik untuk nutrisi dan kesihatan, jika diambil pada dos yang lebih tinggi daripada 50g hingga 80g pada setiap pengambilan (Bogdanov et al., 2008). Lebih

banyak kajian lanjut perlu dijalankan menggunakan dos yang berbeza bagi menentukan dos khusus yang sesuai diperlukan untuk memberikan kesan yang positif terutamanya kepada manusia.

Pada permulaan kajian ini, tikus yang digunakan belum matang sepenuhnya (7-8 minggu) kerana umur tikus dewasa yang matang adalah 26 minggu (Meyer Jr et al., 2006). Kebanyakan kajian yang dijalankan terhadap memori haiwan sehingga kini melibatkan tikus yang tua (Shukitt-Hale et al., 2004) atau tikus yang berpenyakit (Alzheimer, dementia, schizophrenia dan amnesia) (Gu et al., 2009; Langdon et al., 2013; Spieker et al., 2012; Farahmandfara et al., 2012) serta melibatkan kecederaan (Mumby et al., 2002) pada otak. Terdapat banyak kajian telah melaporkan bahawa tekanan oksidatif biasanya lebih mudah berlaku kepada individu yang tua berbanding dengan yang muda sebagaimana kajian yang dijalankan ini; mencadangkan reaksi oksidatif dan tindakan dibantu radikal bebas dikaitkan dengan proses kemerosotan yang berkaitan dengan penuaan (Blasa et al., 2006). Kajian yang melibatkan tikus menunjukkan bahawa kerosakan oksidatif menyebabkan disfungsi kelakuan (Forster et al., 1996). Berdasarkan kajian yang dilakukan yang melibatkan haiwan, kerosakan oksidatif boleh menyebabkan disfungsi neuron dan kognitif ketika proses penuaan manusia (Beckman & Ames, 1998). Beberapa kajian menunjukkan tikus yang muda menunjukkan prestasi memori yang lebih baik berbanding dengan tikus yang lebih tua (Kishore & Singh, 2005). Ini mungkin kerana tikus yang muda menunjukkan kadar metabolisme oksidatif yang lebih tinggi dan peningkatan pengeluaran metabolit oksigen reaktif serta sistem perlindungan antioksidan yang optimum dan dengan itu mampu menurunkan tekanan oksidatif (Saleem et al., 2012). Walau bagaimanapun, terdapat juga kajian yang menunjukkan orang tua lebih menunjukkan kesan peningkatan prestasi berbanding dengan golongan muda (Jarvis, 1993). Oleh itu kajian lanjut pengambilan

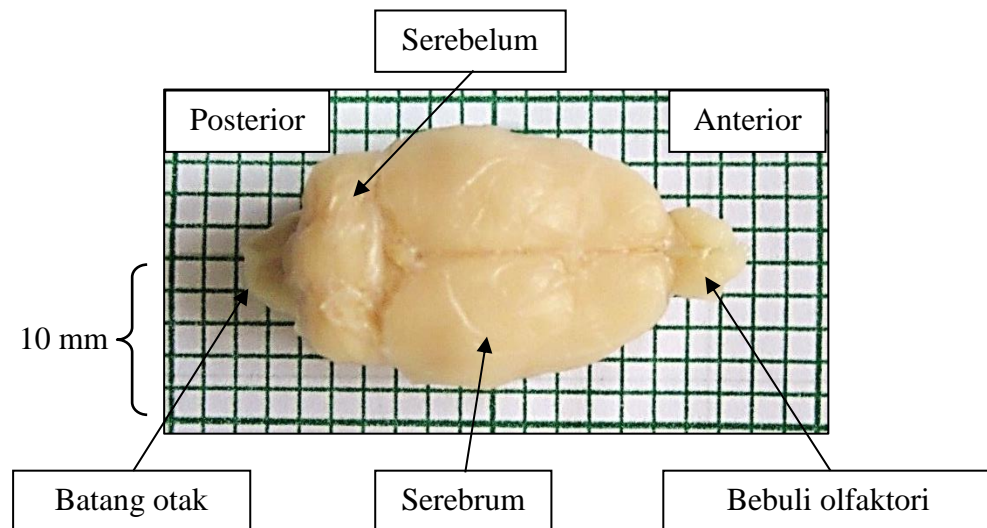
madu oleh tikus yang tua atau berpenyakit mungkin dapat menentukan sama madu memberikan kesan yang sama ke atas tikus tersebut.

Dalam kajian ini, ujian kelakuan menggunakan RAM dilakukan di dalam bilik yang terbuka. Ini mungkin mempengaruhi prestasi persembahan tikus ketika ujian dijalankan. Walau bagaimanapun, terdapat kajian lepas yang turut menjalankan kajian kelakuan di tempat terbuka (Macpherson & Roberts, 2010; Lipp et al., 2001). Prestasi haiwan dalam kajian seumpama ini mungkin dipengaruhi oleh faktor bunyi di kawasan persekitaran yang boleh mengakibatkan stres kepada haiwan-haiwan ini. Stres adalah keadaan atau rangsangan yang mampu menggugat kelangsungan hidup organisma. Bunyi merupakan salah satu tekanan alam sekitar. Seperti yang diketahui pendedahan akut serta jangka panjang kepada bunyi bising boleh mengakibatkan stres oksidatif yang boleh menjejaskan memori pada tikus (Sundaramahalingam et al., 2013). Bagi memori spatial, stres yang kronik boleh merosakkan memori rujukan dan mempunyai kesan yang sementara pada memori kerja (Conrad, 2010). Bagi mengurangkan kesan faktor ini, ujian dijalankan pada masa yang sama, iaitu pada hujung minggu dimana persekitaran adalah sunyi dan pada jam 10 pagi.

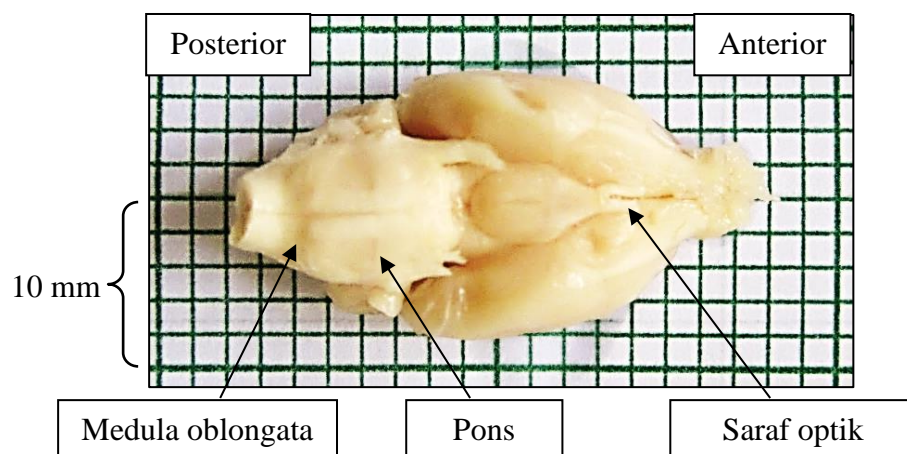
5.2 Morfologi Am Luaran Otak

Tisu otak kelihatan berwarna putih kekuningan. Dari sisi kelihatan kedua-dua serebelum dan serebrum membentuk bonggol di dorsal keseluruhan struktur otak. Pandangan dorsal menunjukkan susunan longitudinal merangkumi batang otak di bahagian paling kaudal, serebelum, serebrum dan bebuli olfaktori yang terletak di bahagian rostral (Rajah 5.4). Permukaan korteks serebrum tikus mempunyai kurang lipatan berbanding dengan haiwan vertebrata yang lebih tinggi. Pandangan ventral otak menunjukkan struktur medula oblongata dan pons yang membentuk batang otak, serta

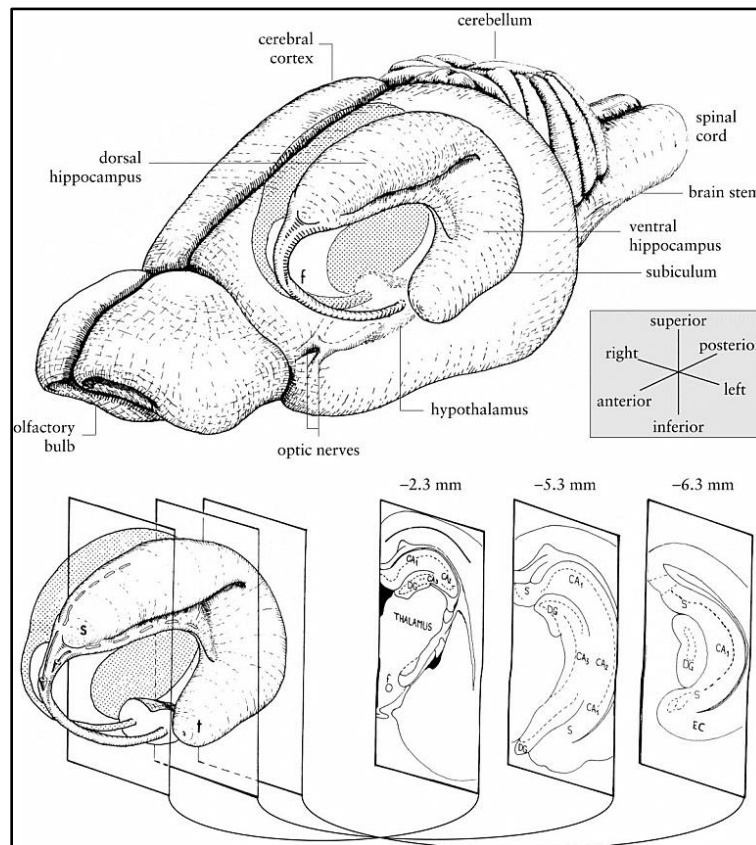
saraf kranium, seperti saraf optik, yang masih melekat pada ventral struktur otak (Rajah 5.5). Medula oblongata adalah struktur otak paling kaudal dan bersambung terus dengan korda spina.



Rajah 5.4: Pandangan dorsal otak tikus



Rajah 5.5: Pandangan ventral otak tikus



Rajah 5.6: Anatomi hipokampus tikus (Cheung & Cardinal, 2005).

Jadual 5.4: Ukuran otak tikus

Kumpulan	Lebar (mm)	Panjang (mm)	Berat (g)
Madu	16 ± 0^a	25.25 ± 0.37^a	1.57 ± 0.04^a
Salin	15.83 ± 0.17^a	24.83 ± 0.30^a	1.73 ± 0.03^a

^aSuperskrip dalam lajur yang sama tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan

Jadual 5.4 menunjukkan ukuran bagi berat, lebar dan panjang otak tikus yang dikeluarkan. Kesemua data mengenai ciri tersebut dikumpulkan mengikut kumpulan bagi memudahkan perbandingan antara dua kumpulan tersebut. Ujian statistik menggunakan ujian *One way* ANOVA, menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada berat, lebar dan panjang otak tikus di antara kumpulan madu dan salin. Oleh itu, pengambilan madu tidak mempunyai kesan ke atas ciri morfologi luaran otak.

Walau bagaimanapun, terdapat kecenderungan pengambilan madu meningkatkan saiz spesifik di bahagian yang mengandungi hipokampus, iaitu kawasan medio temporal otak. Kesemua keputusan ujian statistik ANOVA disertakan di dalam Lampiran C.

Keputusan yang didapati menunjukkan pengambilan madu tidak mengakibatkan kemerosotan tisu otak. Oleh itu, madu tidak memberi kesan negatif ke atas keseluruhan morfologi luaran otak. Ukuran lebar, panjang dan berat keseluruhan otak yang diambil mewakili parameter untuk morfologi am keseluruhan otak. Dalam banyak kajian, penumpuan perbandingan dilakukan bagi melihat kaitan kelakuan kognitif yang kompleks dengan perubahan saiz keseluruhan otak telah dikemukakan andaian bahawa kelakuan yang kompleks sukar dipengaruhi oleh saiz otak yang lebih besar. Walau bagaimanapun, tiada pendapat yang jelas tentang apa yang dimaksudkan dengan saiz keseluruhan otak dan bagaimana saiz mempengaruhi perubahan kelakuan (Healy & Rowe, 2007). Kajian ini sendiri menunjukkan saiz keseluruhan otak tikus di antara dua kumpulan tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan. Pengambilan madu tidak menyebabkan perubahan saiz pada otak tikus.

Kini terdapat kajian yang melihat kepada perubahan saiz pada bahagian tertentu otak berdasarkan fungsinya. Kajian sebegini lebih baik berbanding dengan kajian menggunakan saiz keseluruhan otak kerana ianya memfokuskan kepada kawasan tertentu yang mungkin terlibat secara khusus terhadap kelakuan tertentu (Healy & Rowe, 2007). Kajian menunjukkan bahawa isipadu hipokampus dalam spesis mamalia dan burung yang bergantung kepada memori spatial untuk hidup meningkat. Contoh kemahiran memori tersebut termasuklah pandu arah, migrasi dan memori dalam burung yang menyembunyikan makanan (Lee et al., 1998).

Bahagian paling lebar otak tikus melibatkan bahagian medio temporal. Di sinilah terdapatnya hipokampus (Rajah 5.6: Lakaran otak tikus yang menunjukkan lokasi hipokampus). Kajian ini menunjukkan kecenderungan bahagian otak ini lebih lebar bagi kumpulan yang mengambil madu.

Secara umumnya bentuk hipokampus adalah lebih kurang sama pada pelbagai spesies mamalia, dari *monotremes* seperti *echidna* hingga ke primat seperti manusia (West, 1990). Terdapat juga hubungan di antara saiz hipokampus dan memori spatial, iaitu dalam perbandingan antara spesis yang sama, didapati bagi yang mempunyai kapasiti yang lebih besar untuk ingatan spatial terdapat kecenderungan yang isipadu hipokampusnya adalah lebih besar (Jacobs, 2003). Hubungan ini juga meliputi perbezaan jantina sesuatu spesis di mana jantan dan betina menunjukkan perbezaan yang ketara dalam keupayaan memori spatial dan cenderung untuk menunjukkan perbezaan yang sama dalam isipadu hipokampus (Jacobs et al., 1990).

Kajian yang dilakukan oleh Clayton dan rakan-rakan telah menunjukkan bahawa isipadu hipokampus burung penyimpan makanan seperti *titmice* dan *chickadees* meningkat disebabkan oleh tabiat menyimpan makanan dan mengingat semula tempat simpanan makanan (Suzuki & Clayton, 2000). Terdapat juga kajian menunjukkan saiz hipokampus mempunyai kaitan keupayaan pandu arah pada manusia. Kajian telah dijalankan Maguire et al., (2000) untuk menguji sama ada keupayaan pemandu teksi untuk mengingat jaringan jalan yang kompleks London berhubung kait dengan saiz hipokampus. Hasil kajian menunjukkan pemandu teksi London mempunyai hipokampus posterior yang lebih besar dan hipokampus anterior yang lebih kecil berbanding subjek kawalan dari umur yang sama (Maguire et al., 2000). Walau bagaimanapun, hipokampus manusia tidak mempunyai peta kognitif yang sama dengan tikus; manusia

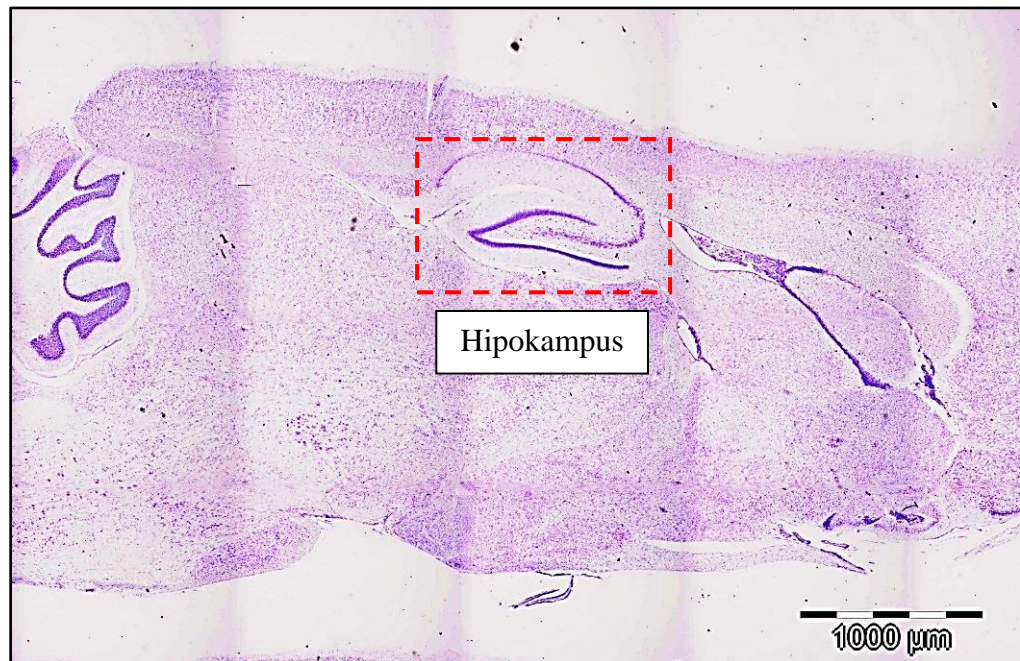
mempunyai deria garisan masa yang tidak terdapat pada tikus (O'Keefe et al., 1998). Kajian semasa mencadangkan walaupun tikus mempunyai memori episodik, iaitu tentang apa, di mana dan bila makanan disimpan, memori ini adalah berbeza secara kualitatif daripada memori episodik manusia (Roberts et al., 2008).

Kajian semasa yang menggunakan teknologi pengimejan mengesahkan bahawa hipokampus memainkan peranan penting untuk pandu arah pada manusia (Maguire et al., 1998). Hipokampus manusia memainkan peranan yang sama dengan hipokampus tikus dalam memproses maklumat spatial. Oleh itu, ia mengukuhkan pendapat bahawa sebahagian besar analisis pelbagai peringkat neurobiologi memori spatial tikus boleh diguna pakai untuk manusia. Dalam ujian *Morris Water Maze*, terdapat beberapa persamaan yang sangat ketara dalam proses pembelajaran yang melibatkan ruang dan memori pada manusia yang diuji dalam versi maya apabila dibandingkan dengan tikus yang diuji dalam ujian sebenar yang nyata (Sutherland, 2010). Hipokampus tikus khususnya merupakan satu model yang baik untuk diguna pakai dalam kajian melibatkan anatomi dan fungsi (Jones & McHugh, 2011).

5.3 Pencirian Histologi Otak

Sama ada melibatkan keratan memanjang (Rajah 5.7) atau keratan rentas (Rajah 5.8), struktur hipokampus mudah dikenali pasti di bahagian terdapatnya susunan unik lapisan CA1-CA2-CA3. Pemerhatian di bawah mikroskop menunjukkan corak lapisan CA1-CA3 berbentuk C yang saling bertaut dengan *dentate gyrus* yang berbentuk V serta kawasan hilus dapat dilihat dalam struktur hipokampus (Rajah 5.8). Lapisan CA1 terdiri daripada sel-sel neuron bersaiz sederhana. Lapisan CA2 adalah medan peralihan antara lapisan CA1 dan lapisan CA3. Lapisan CA3 mempunyai sel-sel neuron bersaiz

besar yang kurang padat, manakala lapisan CA4 adalah sambungan daripada lapisan CA3 di dalam kelekukan *dentate gyrus*.

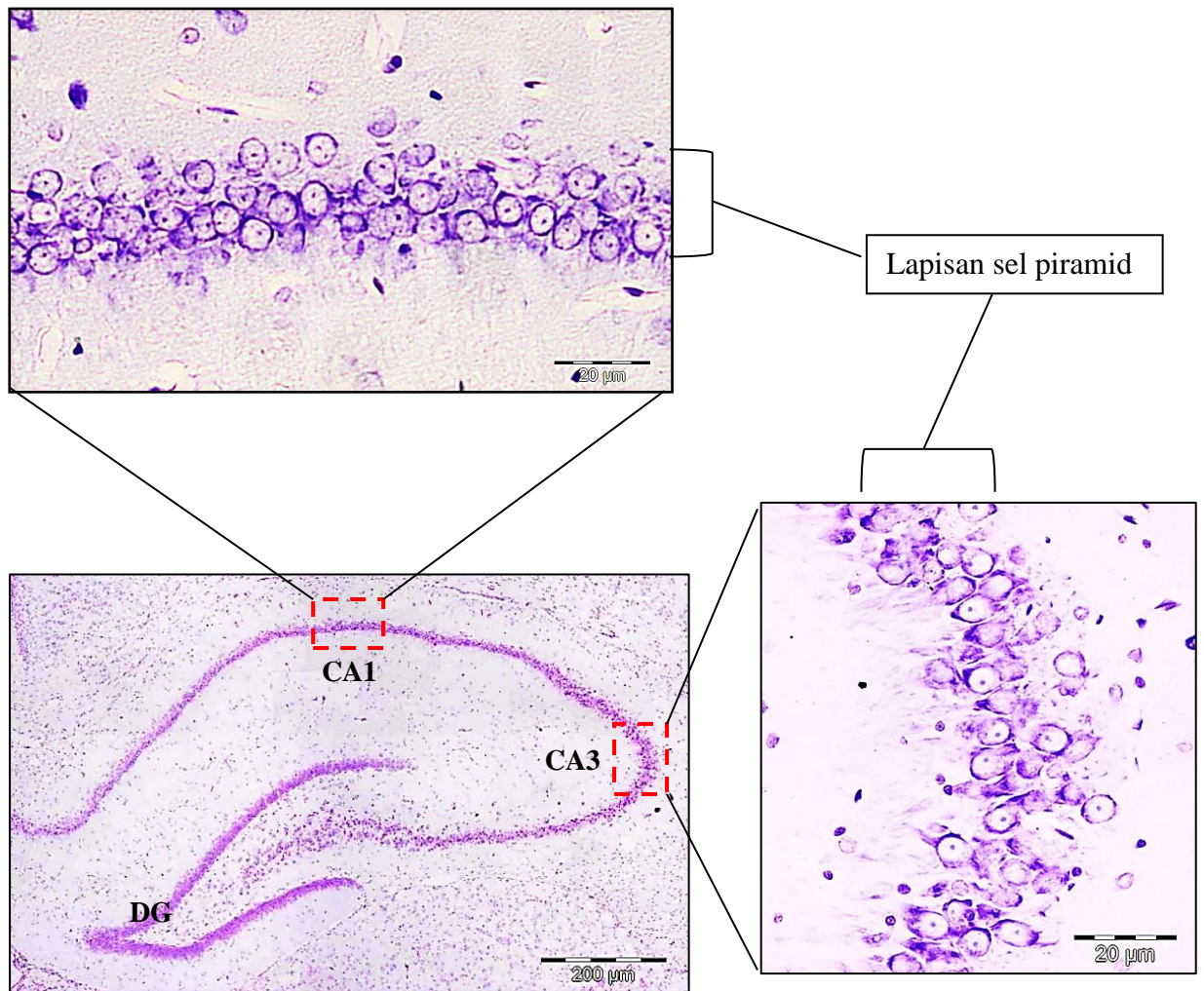


Rajah 5.7: Keratan memanjang otak tikus (40x)

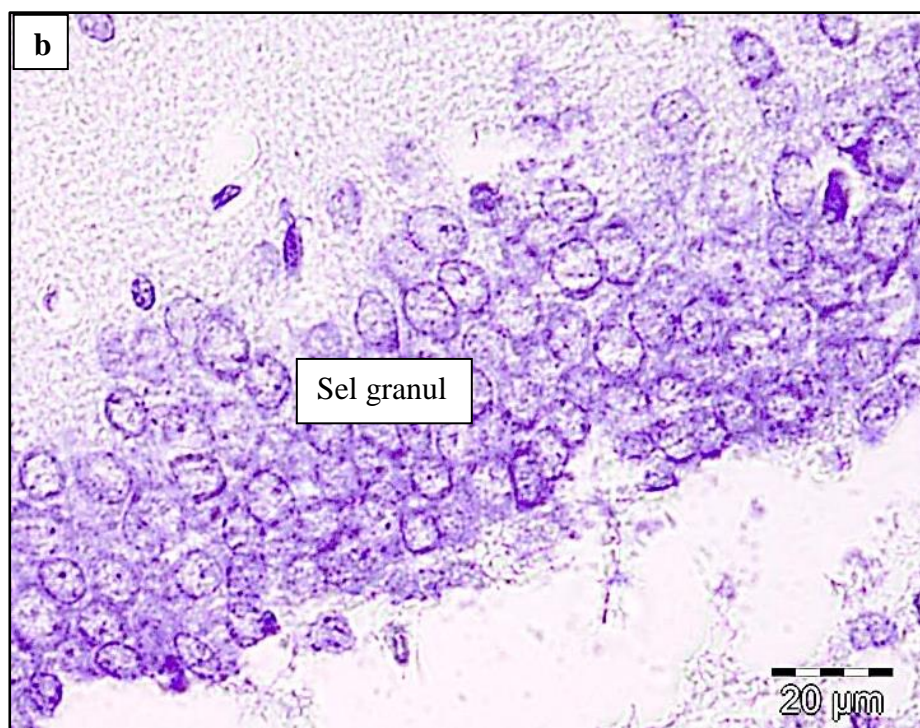
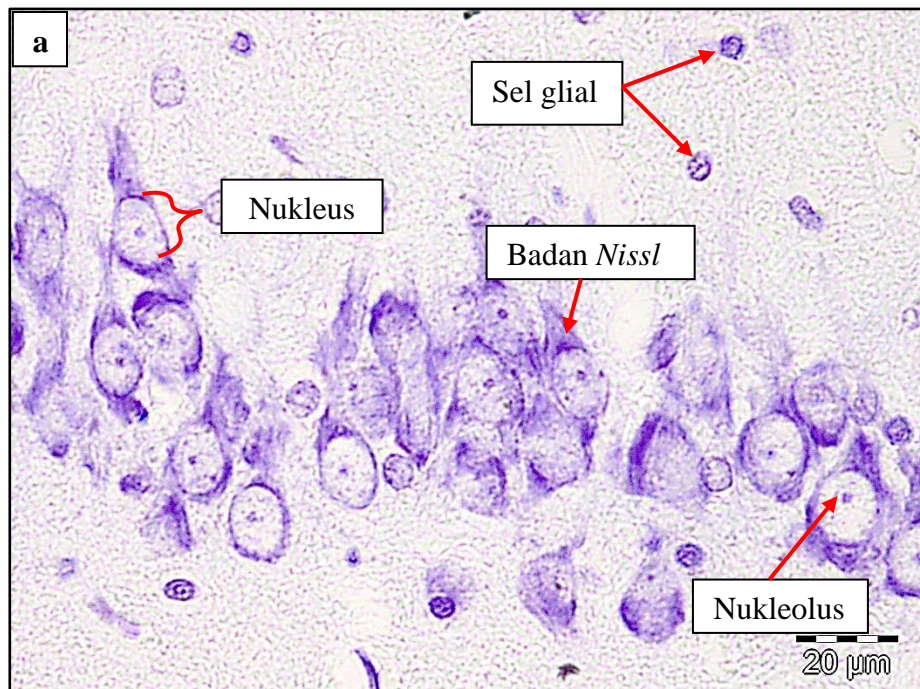


Rajah 5.8: Keratan rentas otak tikus (40x)

Amnya, ketiga-tiga kawasan lapisan yang dipilih menunjukkan keputusan yang konsisten bagi semua sampel (Rajah 5.9)

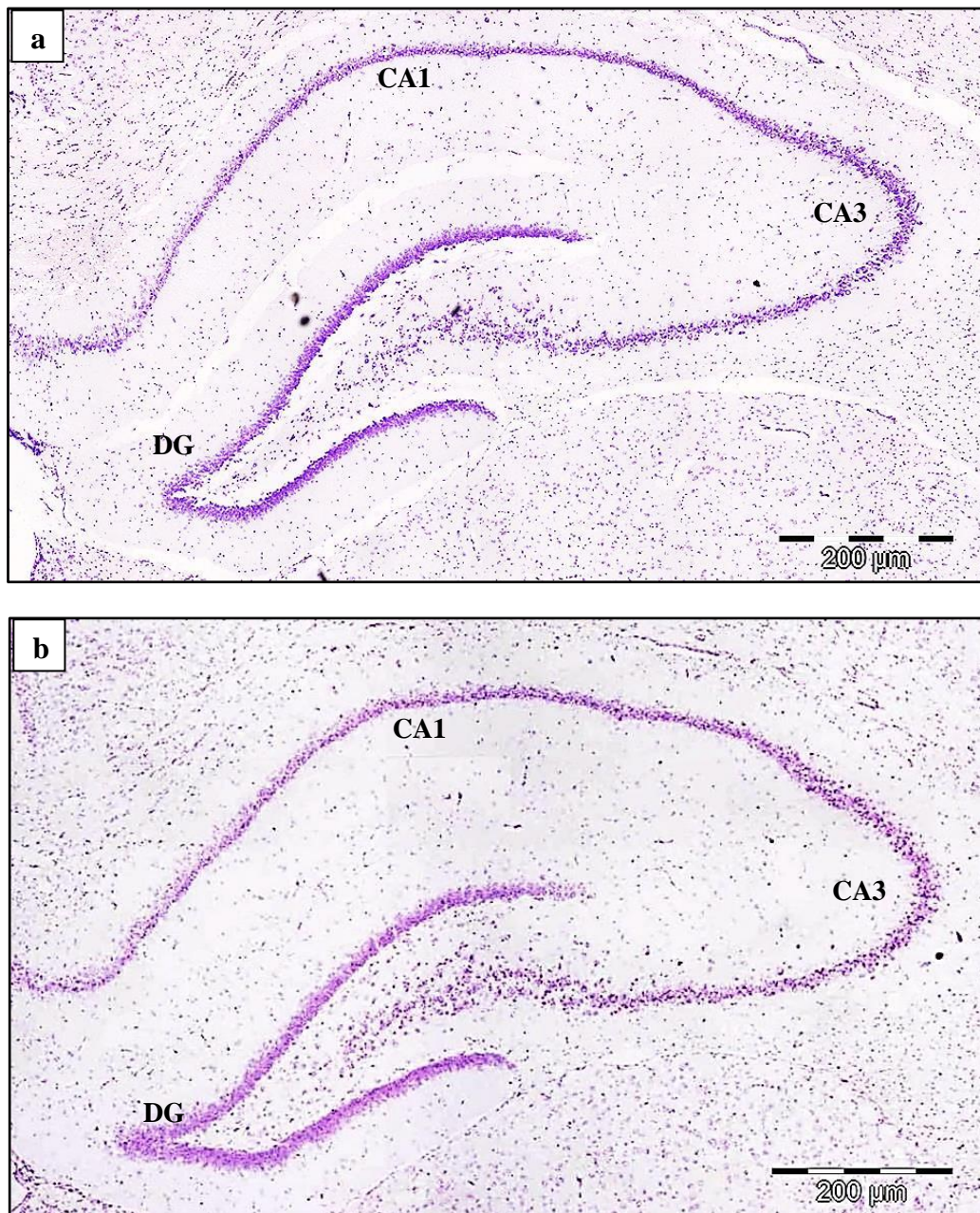


Rajah 5.9: Keratan rentas hipokampus. Kawasan CA1, CA3 dan *dentate gyrus* (DG)



Rajah 5.10: Jenis sel yang terdapat di hipokampus: (a) sel piramid dan (b) sel granul

(400x)



Rajah 5.11: Struktur hipokampus: (a) kumpulan kawalan dan (b) kumpulan rawatan

Semua struktur khusus dalam hipokampus ini dapat dilihat secara jelas dengan teknik *Nissl*. Dengan menggunakan teknik pewarnaan ini, sitoplasma diwarnakan dengan warna biru terang kepada ungu terang. Badan *Nissl* dan nukleus adalah berwarna ungu gelap (Rajah 5.10a). *Dentate girus* dilihat sebagai struktur bergelung dengan bahagian cekung terbuka menghala ke arah *hipocampus proper* (Rajah 5.9).

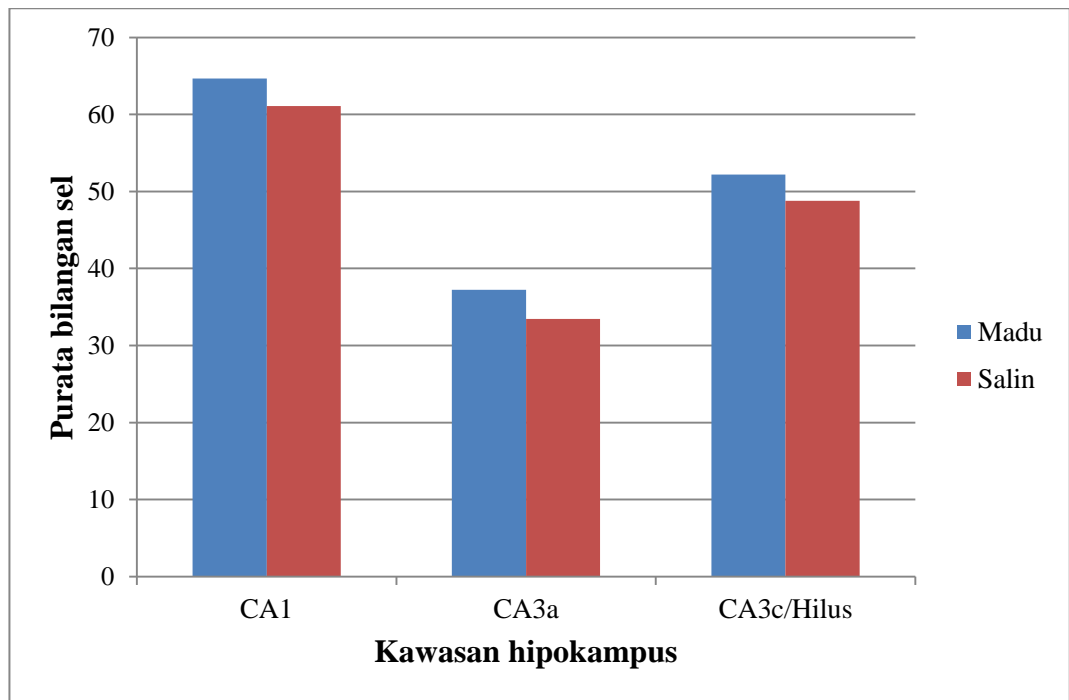
Hanya neuron-neuron yang nukleus dan nukleolus jelas kelihatan melalui teknik pewarnaan *Nissl* (Rajah 5.10a) sahaja yang dikira. Sel yang terdapat di hipokampus jelas kelihatan seperti sel neuron piramid, sel neuron granul dan sel glial (Rajah 5.10). Walau bagaimanapun, perbandingan struktur hipokampus di antara kedua-dua kumpulan tidak menunjukkan sebarang perbezaan (Rajah 5.11).

Dalam analisis kuantitatif, pengiraan sel melibatkan lapisan sel piramid hipokampus (CA1 dan CA3a) dan CA3c/*hilus dentate*. Keputusan menunjukkan terdapat perbezaan bilangan sel yang signifikan di antara kumpulan rawatan (CA1=64.66±0.65; CA3a=37.24±0.65; CA3c/Hilus=52.21±0.65) dan kumpulan kawalan (CA1=61.11±0.65; CA3a=33.46±0.65; CA3c/Hilus=48.78±0.65). Lapisan bagi keduanya CA1 mencatat bilangan sel paling banyak diikuti hilus dan CA3 (Jadual 5.5 dan Rajah 5.12).

Jadual 5.5: Bilangan neuron piramid hipokampus

Kumpulan	Purata bilangan sel (Min±SEM)		
	CA1	CA3a	CA3c/Hilus
Madu	64.66±0.65 ^a	37.24±0.65 ^a	52.21±0.65 ^a
Salin	61.11±0.65 ^b	33.46±0.65 ^b	48.78±0.65 ^b

Nilai $p < 0.05$ dianggap signifikan. Min dengan superskrip yang berbeza (a, b) dalam baris yang sama dianggap mempunyai perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) mengikut jenis rawatan.



Rajah 5.12: Purata bilangan sel piramid hipokampus mengikut kawasan

Amnya, keputusan adalah sama dengan laporan kajian tentang hipokampus tikus. Tiga bahagian utama hipokampus yang jelas kelihatan adalah lapisan CA1, CA3 dan *dentate girus*. Sel piramid tersusun membentuk lapisan sel piramid pada kawasan CA1 dan CA3 (Rajah 5.9). Sel piramid CA3 dan CA1 adalah jenis sel utama yang terdapat di kawasan *hippocampus proper* (Mizuseki et al., 2012). Seperti kajian lain, pewarnaan *Nissl* menunjukkan pembahagian yang jelas di antara sel granul di *dentate gyrus* dan sel piramid di tanduk Ammon yang terdiri daripada lapisan CA1 yang mengandungi neuron piramid kecil dan lapisan CA3 yang mengandungi neuron piramid besar (Lein et al., 2005).

Neuron sel piramid CA2 berkongsi ciri-ciri morfologi dengan sama ada CA1 atau bahagian proksimal CA3 (CA3a) (Bartesaghi dan Ravasi, 1999; Ishizuka et al., 1995) dan ini membawa kepada beberapa perdebatan mengenai peranan CA2 sebagai kawasan kecil hipokampus dan bukan sekadar zon peralihan antara CA3 dan CA1

(Gaarskjaer, 1986; Woodhams et al, 1993). Kawasan CA2 dicirikan oleh Lorente de Nó (1934) sebagai sel-sel piramid besar seakan CA3 yang tidak menerima input *mossy fiber*. Kawasan CA2 sukar dikenalpasti jika menggunakan teknik pewarnaan *Nissl* dan hal yang sama ditemui dalam kajian ini. Teknik pewarnaan *Nissl* yang dijalankan pada spesis rodent yang berlainan menunjukkan perbezaan lapisan sel piramid CA2 dengan jelas dan taburan sel seperti sel piramid yang tidak teratur (Scorza et al., 2010). Oleh itu, ada cadangan bahawa CA2 merupakan kawasan yang berbeza dari segi anatomi dan fungsi, walaupun sempadan kawasan ini adalah tidak jelas (Lein et al., 2005).

Dentate gyrus (DG) adalah substruktur pembentukan hipokampus. Ia kelihatan seperti satu struktur berbentuk V melingkari hujung sel piramid CA3. Kawasan *dentate gyrus* dibahagikan kepada tiga lapisan, iaitu molekul, granular dan polimorf (juga dikenali sebagai hilus). Lapisan molekul terletak di luar lapisan sel granular yang mengandungi banyak bilangan sel yang kecil, padat dan mempunyai saiz yang seragam. Lapisan sel molekul dan granular sebahagiannya meliputi lapisan polimorf, yang mengandungi sel polimorfik besar yang jarang (Dalley et al., t.t). Sel granular adalah jenis sel utama yang ditemui di lapisan *dentate gyrus* dan ianya tersusun rapat.

Bilangan sel piramid di kawasan CA1, CA3 dan hilus pada hipokampus tikus yang dirawat dengan Madu Tualang menunjukkan perbezaan yang signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan (Jadual 5.5). Ini disokong dengan hasil kajian kelakuan yang menunjukkan tikus yang dirawat dengan madu kurang melakukan kesalahan memori kerja dan memori rujukan berbanding dengan kumpulan kawalan. Prestasi memori dan jumlah sel piramid oleh kedua-dua kumpulan mungkin dipengaruhi oleh stres semasa ujian dijalankan. Terdapat kajian mengenai hal ini yang melaporkan

bahawa stres mempengaruhi prestasi memori jangka masa panjang dan pendek serta bilangan sel di kawasan CA1 dan CA3 (Badriya et al., 2013).

Kajian menunjukkan bahawa CA1 mencatat bilangan sel piramid paling banyak diikuti hilus dan CA3 (Jadual 5.5) bagi kedua-dua kumpulan. Kawasan CA1 adalah lebih dekat dengan kawasan output hipokampus dan ia adalah penting bagi mengenalpasti ruang dalam persekitaran, di mana sel-sel dalam kawasan CA1 mengekod isyarat ruang dan seterusnya ingatan jangka panjang untuk ruang. Kandel mencadangkan bahawa proses memori jangka panjang melibatkan kawasan CA1 (DNA Learning Center, t.t.a).

Kawasan CA1 dan CA3 dikatakan penting bagi memori spatial. Terdapat kajian yang menunjukkan kawasan CA3 hipokampus memainkan peranan yang penting dalam pengekodan maklumat spatial baru dalam ingatan jangka pendek (Kesner, 2007).

Dalam tugas yang berbeza didapati tikus yang dikenakan lesi/kecederaan pada CA1 dan CA3a, CA3b (nomenklatur oleh Lorente de Nó, 1934) yang menjalani ujian untuk mengingat beberapa tempat, menunjukkan penurunan prestasi. Lesi pada CA1 dan CA3a, CA3b mengganggu penempatan semula tempat yang dilawati sebelumnya (Lee et al., 2005; Kesner, 2007). Kajian turut melaporkan bahawa kepadatan neuron dalam kawasan CA1 menunjukkan penurunan ketara, berbanding dengan kawasan-kawasan lain yang telah dianalisis. Kepadatan neuron menggambarkan bilangan neuron per unit kawasan.

Sel piramid dikawasan CA3 mungkin memainkan peranan penting dalam tugas yang melibatkan ingatan jangka pendek dengan tempoh beberapa saat dan minit, terutama apabila tugas yang melibatkan pengekodan maklumat baru atau proses penyiapan corak ruang. Apabila tempoh tugas dipanjangkan melebihi tempoh jangka pendek (contohnya, 5 minit atau 24 jam), CA3a, b tidak lagi memainkan peranan utama untuk mendapatkan semula memori kerana CA1 memainkan peranan yang lebih penting selepas penangguhan tugas tersebut (Lee & Kesner, 2003). CA3a, b juga membantu urutan pemprosesan maklumat dengan bantuan CA1 berdasarkan output kolateral *Schaffer* dari CA3a, b kepada CA1 (Kesner, 2007).

Kajian mendapati bahawa haiwan dengan lesi pada CA3c menunjukkan penurunan pemprosesan maklumat spatial yang lebih besar daripada haiwan dengan lesi pada CA3a, b (Hunsaker et al., 2008). Penyelidikan-penyelidikan awal yang dilakukan oleh Li et al., (1994), dan Buckmaster & Schwartzkroin (1994), telahpun mencadangkan sel *mossy* menerima input rangsangan daripada sel granul dan sel piramid CA3c dan mengintegrasikan input daripada sel granul dan sel piramid CA3c, serta melalui rangsangan yang berulang mengaktifkan banyak sel granul. Oleh itu, CA3c mungkin mempunyai output yang boleh mempengaruhi sel granul *dentate gyrus* (Scharfman, 2007; Kesner, 2007).

Hipokampus adalah penting sebagai tempat penyimpanan awal untuk memori jangka panjang, dan ia terlibat dalam peralihan memori jangka panjang kepada memori yang lebih kekal. Beberapa kajian menyokong pandangan ini, contohnya Olton et al., (1979) yang mencadangkan bahawa hipokampus terlibat dalam pembentukan memori kerja tetapi tidak dalam memori rujukan. Walau bagaimanapun terdapat laporan bercanggah seperti laporan Jarrard et al., (1984) yang mendapati gangguan ringan dan

sementara terhadap prestasi tugas yang melibatkan memori spatial rujukan selepas kerosakan yang disebabkan oleh *colchicine*, namun kesan tersebut hilang dalam tempoh ujian dilakukan. McLamb et al., (1988) pula menunjukkan bahawa keupayaan tikus yang dirawat dengan *colchicine* terjejas dengan ketara dalam melaksanakan kedua-dua tugas yang melibatkan memori rujukan dan memori kerja (DNA Learning Center, t.t.b).

Sistem saraf pusat terdedah kepada bahan radikal bebas akibat tekanan oksidatif, kerana ia kekurangan dalam perlindungan radikal bebas dan menggunakan 20% daripada keseluruhan oksigen badan (Olanow, 1992). Sebagaimana yang dipetik oleh Bayani Uttara et al., (2009), Floyd dan Carney (1992) menyatakan aktiviti antioksidasi dalam otak adalah lebih rendah berbanding dengan tisu yang lain, sebagai contoh, kira-kira 10% daripada hati. Sel saraf dianggap lebih mudah terdedah kepada kerosakan oksidatif berbanding tisu badan yang lain (Uttara et al., 2009).

Kajian klinikal menunjukkan *neurodegeneration* dapat dikawal dengan pengambilan diet atau makanan tambahan antioksidasi semulajadi. Pengambilan makanan yang mengandungi pelbagai vitamin, antioksidasi tambahan dapat memainkan peranan penting sebagai *neuroprotection* untuk mengurangkan pelbagai gangguan kepada tisu saraf. Antioksidasi semulajadi mencegah pengoksidaan protein, *peroxidations lipid* dan mengelakkan penjanaan ROS, sekali gus bertindak sebagai rintangan terapeutik untuk OS (Uttara et al., 2009).

Madu Tualang dilaporkan adalah sumber antioksidasi yang baik. Madu Tualang mungkin mempunyai mekanisme *neuroprotection*, meningkatkan memori, serta mengurangkan kerosakan hipokampus melalui beberapa faktor seperti sifat

antioksidanya, pengawalaturan daripada *brain derived neurotrophic factor* (BDNF)⁷ atau peningkatan aktiviti *choline acetyltransferase*⁸ dan *acetylcholinesterase*⁹ di kawasan otak tertentu atau gabungan daripada mekanisme-mekanisme ini. Walau bagaimanapun, kajian lanjut perlu dilakukan untuk mengesahkan aktiviti kolin dan asetilkolina serta mekanisme neuroprotektif Madu Tualang (Badriya et al., 2013).

Tikus dalam kajian ini terdedah kepada stres yang berterusan ketika ujian kelakuan dijalankan dan ini berkemungkinan mempengaruhi prestasi memorinya. Kajian yang melibatkan tikus dan manusia telah menunjukkan bahawa hipokampus bukan sahaja terlibat dalam pembentukan memori, tetapi juga sangat sensitif terhadap stres (Kim & Diamond, 2002). Stres memberi kesan kepada struktur dan fungsi neuron hipokampus (Fenoglio et al., 2006). Tekanan juga boleh mempengaruhi LTP, yang terlibat aktiviti pembelajaran dan memori (Diamond et al., 1995; Bremner, 1999). Bunyi yang terhasil oleh keadaan persekitaran adalah antara penyebab stres. Pendedahan akut kepada bunyi menyebabkan tekanan oksidatif (Sundaramahalingam et al., 2013) dan stres yang kronik boleh mengakibatkan kesan buruk kepada hampir setiap kawasan otak. Keupayaan spatial hipokampus juga bergantung kepada penglibatan struktur otak lain semasa sesi latihan dan ujian kelakuan (Conrad, 2010). Stres sederhana yang melibatkan bunyi boleh menjejaskan aktiviti pembelajaran dan memori (Ghalamghash et al., 2012).

Dalam kajian ini, sel piramid di lapisan CA1, CA3a dan CA3c/hilus pada tikus yang dirawat dengan madu menunjukkan bilangan sel yang lebih banyak berbanding dengan kumpulan kawalan. Kajian yang dijalankan Padurariu et al., (2012) menunjukkan terdapat penurunan bilangan sel yang signifikan pada hipokampus

⁷ BDNF adalah protein yang aktif dalam hipokampus, korteks, otak depan, bertindak ke atas neuron tertentu dalam sistem saraf pusat dan perifer, membantu untuk menyokong survival neuron yang sedia ada dan menggalakkan pertumbuhan dan pembedaan neuron baru.

⁸ Enzim yang penting bagi pembentukan peneuropancar asetilkolin.

⁹ Enzim yang bertindak semasa proses hidrolisis peneuropancar asetilkolin.

penyakit Alzheimer berbanding kumpulan kawalan. Hasil kajian juga mendapati penurunan kepadatan neuron hipokampus adalah lebih ketara dikawasan CA1 dan juga CA3 (Padurariu et al., 2012). Oleh itu, berdasarkan kajian ini, dijangka bahawa Madu Tualang mungkin boleh mendatangkan kesan yang positif terhadap bilangan sel hipokampus pada pesakit Alzheimer. Madu Tualang dijangka boleh digunakan sebagai rawatan alternatif bagi pesakit Alzheimer dan juga penyakit *neurodegenerative* yang lain. Ia mungkin tidak dapat menghalang penyakit tersebut daripada berlaku, tetapi ia mungkin dapat melambatkan proses penyakit tersebut. Walau bagaimanapun kajian lanjut harus dilakukan bagi melihat kesan sebenar Madu Tualang terhadap penyakit tersebut dan mekanisma yang terlibat.

Adalah masih tidak diketahui sama ada atrofi hipokampus boleh dipulihkan pada manusia atau pun tidak, tetapi terapi kognitif menunjukkan kesan positif terhadap gangguan memori remaja Lubnan dengan PTSD (Saigh, 1988). Di samping itu, telah ditemui bahawa hipokampus adalah unik kerana keupayaannya untuk menjana semula neuron (Gould et al., 1998) dan dengan itu mencadangkan bahawa kerosakan atau kematian neuron boleh dipulihkan (Bremner, 1999).

Berdasarkan keputusan kajian ini, terdapat dua andaian yang dapat dibuat. Pertama, madu mungkin memainkan peranan sebagai agen neuroprotektif. Seperti yang dibincangkan sebelum ini, penurunan bilangan neuron yang mungkin dipengaruhi oleh stres dijangka dapat dikurangkan dalam kumpulan rawatan. Madu sebagai agen neuroprotektif mungkin mencegah bilangan neuron daripada merosot. Walau bagaimanapun, pemerhatian terhadap imej keseluruhan hipokampus dari kedua-dua kumpulan tidak menunjukkan perbezaan yang ketara.

Andaian kedua yang dapat dibuat adalah madu mempunyai kesan positif dalam peningkatan bilangan neuron hipokampus yang berkait dengan aktiviti pembelajaran dan pembentukan memori. Semasa ujian kelakuan dijalankan, proses pembelajaran dan memori berlaku pada tikus. Tikus dikehendaki mengingat ligan yang mempunyai makanan menggunakan isyarat visual yang terdapat disekeliling RAM. Proses ini melibatkan pengaktifan neuron dan mungkin meningkatkan bilangan neuron. Berdasarkan andaian ini, madu mungkin membantu proses pembelajaran dan meningkatkan memori. Walau bagaimanapun, kajian lanjut perlu dijalankan mengesahkan hal ini.

BAB 6: PERBINCANGAN AM DAN KESIMPULAN

6.1 Pelaksanaan Kajian

Kajian saintifik mengenai kesan pengambilan madu terhadap memori adalah sedikit. Begitu juga dengan kajian mengenainya dari perspektif Islam. Oleh itu, dalam kajian ini, kesan madu tempatan (Madu Tualang) dilihat dari perspektif sains malah juga dari perspektif Islam.

Madu adalah salah satu makanan yang digalakkan dalam Islam untuk tujuan kesihatan. Saranan penggunaan madu sebagai penawar bukan sahaja disebut di dalam al-Qur'an, malah di dalam hadith dan kitab penulisan sarjana Islam. Madu disebut sebanyak dua kali di dalam al-Qur'an, iaitu disebut secara langsung di dalam surah *Muhamad* dan secara tidak langsung di dalam surah *al-Nahl*. Beberapa hadith juga turut menyebut tentang penggunaan madu sebagai penawar kepada beberapa penyakit, seperti sakit perut. Namun begitu, saranan penggunaan madu untuk memori hanya dinyatakan oleh para sarjana Islam. Mereka juga turut menyediakan resepi yang melibatkan madu di samping bahan-bahan lain untuk menguatkan memori. Walaupun tiada pendokumentasian yang menunjukkan resepi tersebut terbukti keberkesanannya, ia tetap membuktikan madu turut memainkan peranan dalam resepi yang dihasilkan untuk menguatkan memori.

Seperti yang telah dinyatakan sebelum ini, terdapat beberapa sarjana Islam menulis tentang ramuan yang melibatkan penggunaan madu digunakan untuk meningkatkan memori. Namun keberkesanan ramuan tersebut tidak terbukti secara saintifik. Oleh itu, kajian bagi melihat keberkesanan ramuan yang dihasilkan patut

dilakukan. Turut boleh dilakukan adalah penggunaan madu bersama bahan-bahan lain untuk melihat kesan sinerginya terhadap memori.

Kajian mengenai kesan positif madu terutamanya madu tempatan terhadap memori kurang dilakukan walaupun terdapat beberapa kajian yang dilakukan mengenai kesan madu terhadap masalah kesihatan yang lain. Kebanyakan kajian yang dilakukan adalah mengenai kesan madu terhadap luka (Tan et al., 2012) dan sperma tikus (Syazana et al., 2011). Madu Tualang telah dipilih untuk kajian ini dan ia adalah salah satu madu tempatan di Malaysia. Hasil kajian kelakuan menggunakan *Radial Arm Maze* (RAM) bagi melihat kesan Madu Tualang ke atas memori spatial tikus menunjukkan tikus dari kumpulan yang mengambil Madu Tualang kurang melakukan kesilapan memori kerja dan rujukan berbanding dengan kumpulan kawalan (salin). Ini mungkin kerana kandungan antioksida dan kandungan glukosa yang terdapat dalam madu. Madu Tualang terbukti adalah antara madu tempatan yang mempunyai kandungan antioksida yang tinggi. Antioksida madu yang utama adalah kandungan fenolik disamping beberapa komponen bukan fenolik yang menyumbang kepada ciri antioksida madu, seperti protein, asid glukonik, asid askorbik, peroksida dan *hydroxymethylfuraldehyde*. Kapasiti antioksida madu mungkin disebabkan oleh gabungan aktiviti dan interaksi daripada pelbagai sebatian seperti fenolik, peptida, asid organik, enzim, hasil tindak balas Maillard dan mungkin juga komponen kecil yang lain (Gheldof et al., 2002). Dalam satu kajian menggunakan madu *buckwheat* ke atas 37 orang dewasa yang sihat (dos 1.5g/kg berat badan) dan sirap jagung sebagai kumpulan kawalan, didapati jumlah kandungan fenolik plasma dan antioksida plasma meningkat secara signifikan ($p < 0.05$) (Ajibola et al., 2012). Madu Tualang terbukti mengandungi sebatian fenolik yang mempunyai aktiviti antioksida yang baik, iaitu setanding dengan jenis madu lain yang dilaporkan oleh kajian-kajian lepas (Mohamed et al., 2010). Terdapat enam jenis asid

fenolik yang di temui di dalam Madu Tualang (*Gallic, syringic, benzoik, trans-cinnamic, p-coumaric, dan asid caffeic*) serta lima jenis flavonoid (*catechins, kaempferol, naringenin, luteolin dan apigenin*). Walaubagaimana pun, vitamin, enzim, asid amino, unsur surih, dan bahan lain di dalam Madu Tualang masih belum lagi dikenalpasti (Sarfaz & Nor Hayati, 2013). Oleh itu, kajian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengenal pasti komponen biologi aktif lain yang terdapat di dalam Madu Tualang yang mungkin memainkan peranan penting dalam mekanisme tindakan madu.

Bagi memastikan otak untuk berfungsi dengan baik, perlu ada jumlah glukosa yang minimum di dalam darah yang boleh melepasi *blood-brain barrier*¹⁰ pada saluran darah di dalam otak untuk glukosa digunakan oleh sel-sel tisu otak. Apabila otak berfungsi, seperti menukarkan maklumat kepada memori, otak menggunakan glukosa dalam jumlah yang banyak sebagai tenaga dalam proses tersebut. Oleh itu, Madu Tualang boleh memberi kesan positif melalui kandungan glukosanya. Otak akan mempunyai banyak bahan untuk digunakan, jika seseorang itu mengambil glukosa dalam jumlah yang mencukupi (Owens et al., 2010; Canal et al., 2005). Kajian terhadap tikus dan manusia menunjukkan bahawa pengambilan glukosa boleh meningkatkan daya ingatan (Canal et al., 2005; Donohoe & Benton, 1999) disebabkan oleh kandungan glukosa darah yang mencukupi, serta perbezaan seseorang dalam pengawalan glukosa (Donohoe & Benton, 1999). Ada kajian menunjukkan bahawa salah satu faktor yang mengakibatkan kecacatan kognitif adalah paras glukosa darah yang rendah secara konsisten (Foster et al., 1998). Glukosa juga didapati mempunyai kesan positif ke atas orang dewasa yang sihat, dan meningkatkan fungsi kognitif di kalangan orang dewasa yang mempunyai masalah ingatan (Foster et al., 1998). Owens et al., (2010) mendapati

¹⁰ *Blood-brain barrier* Adalah suatu mekanisme penapisan kapilari yang membawa darah ke otak dan saraf tunjang dengan membenarkan bahan-bahan tertentu sahaja melaluinya seperti glukosa dan asid amino

bahawa pengambilan glukosa dalam dos yang lebih besar mempunyai kesan positif dalam ujian mengingat perkataan berbanding penggunaan dos yang lebih rendah; (60g berbanding 20g) (Owens et al., 2010). Walau bagaimanapun, ini bertentangan dengan kajian yang mendapati bahawa diet dengan kandungan tenaga yang tinggi boleh menjejaskan fungsi kognitif dan ingatan (Kanoski & Davidson, 2010). Ini menunjukkan bahawa terdapat kepelbagaian tentang kemampuan memproses glukosa di dalam darah yang optimum bagi setiap individu.

RAM telah disesuaikan untuk menilai memori kerja dan memori rujukan sekaligus (Mishima et al., 1986). Selain itu, kajian menunjukkan bahawa prestasi dalam RAM dipengaruhi oleh faktor bilangan lengan RAM (Van Haaren et al., 1987), (Juraska et al., 1984), protokol ujian memori, jantina (Seymour et al., 1996), spesis (D'Hooze & de Deyn (2001), umur (Kobayashi et al., 1988) dan diet (Endo et al., 1994).

Tikus jantan *Sprague-Dawley* telah dipilih untuk digunakan di dalam kajian ini. Kajian terhadap tikus menunjukkan persamaan pada manusia yang menunjukkan lelaki menunjukkan prestasi kognitif spatial yang baik. Laporan meta-analisis semasa menunjukkan bahawa tikus jantan mempunyai menunjukkan prestasi yang lebih baik dalam memori kerja dan memori rujukan (Chai & Jacobs, 2009). Oleh itu, tikus boleh menjadi model yang sesuai bagi pembelajaran spatial lelaki (Jonasson, 2005). Perbezaan jantina pada manusia dalam penggunaan isyarat telah didapati dalam pelbagai ujian yang melibatkan ruang, seperti melukis peta (Spencer & Weetman, 1981), memberi arahan lisan (Dabbs et al., 1998), bergerak di sekitar *maze* maya janaan komputer (Sandstrom et al., 1998) dan ujian yang melibatkan peta di dunia sebenar (Saucier et al., 2002).

Lelaki biasanya menunjukkan prestasi yang lebih baik daripada perempuan dalam ujian berkaitan ruang. Kajian awal yang melaporkan kesan jantina adalah tidak konsisten.

Prestasi haiwan makmal dalam ujian spatial adalah bergantung kepada perubahan hormon (Williams et al., 1990) dan prestasi yang tidak seimbang sepanjang kitaran haid pada wanita juga memberi kesan (Epting & Overman, 1998).

Terdapat juga kesan yang berbeza melibatkan jantina serta jenis tikus. Contohnya, tikus *Sprague-Dawley*, *Fisher* dan *Long Evans* jantan menunjukkan prestasi yang lebih baik berbanding dengan jenis tikus yang lain, seperti jenis *Wistar* yang menunjukkan prestasi kurang baik (Jonasson, 2005).

Sehingga kini tiada kajian dilakukan tentang kesan pengambilan madu ke atas perubahan saiz otak. Clutton-Brock dan Harvey (1980) seperti yang dinyatakan oleh Healy dan Rowe (2007) melaporkan bahawa diet memainkan peranan dalam perubahan saiz otak primat bukan manusia. Hasil kajian menunjukkan tiada perubahan ketara pada saiz keseluruhan otak di antara kumpulan rawatan (Madu Tualang) dan kumpulan kawalan (salin), walaupun otak kumpulan rawatan didapati besar sedikit. Ini selari dengan kajian semasa yang menunjukkan perkaitan kepelbagaian saiz keseluruhan otak tidak begitu membantu untuk memahami bagaimana struktur otak mempengaruhi kelakuan.

Para saintis tidak bersetuju bahawa hanya saiz keseluruhan otak sahaja digunakan sebagai petanda untuk menilai hubungan antara otak dan kelakuan. Tiada gambaran yang jelas tentang bagaimana perubahan dalam saiz menyebabkan perubahan

pada kelakuan. Beberapa pembolehubah ekologi dan sejarah kehidupan dilaporkan berkait rapat dengan perubahan saiz keseluruhan otak. Terdapat juga kajian melihat perubahan saiz bahagian tertentu otak dan kaitannya terhadap fungsi tertentu; contohnya kajian perkembangan fungsi kognitif yang mungkin dipengaruhi oleh pembesaran bahagian tertentu otak (Healy & Rowe, 2007), dan saiz hipokampus mempengaruhi kebolehan pembelajaran spatial pada burung (Biegler et al., 2001).

Otak mempunyai pelbagai kawasan yang dikaitkan dengan fungsi khusus, seperti untuk memproses deria, untuk kawalan motor, serta kognisi. Perubahan ketara kepada satu, atau beberapa bahagian otak tidak boleh dikesan dengan mengukur seluruh otak. Sebagai contoh, satu eksperimen yang dilakukan pada burung (passerines) mendapati bahawa saiz *Higher Vocal Centre* (HVC) (kawasan otak yang memainkan peranan penting dalam pengeluaran lagu) mempunyai kaitan dengan kerumitan lagu, manakala ukuran saiz keseluruhan otak tidak memainkan peranan (Spencer et al., 2005). Jisim otak biasanya diukur secara terus dan dilakukan apabila otak haiwan yang hampir mati diawet secara *intracardiac perfusion* dan diawet selanjutnya sebelum proses histologi. Teknik ini telah digunakan dalam analisis kajian semasa. Dalam kajian lain, jisim otak diukur dari haiwan yang telah mati, contohnya, dari spesimen yang telah dibekukan (Møller et al., 2005). Walau bagaimanapun, kaedah ini mungkin boleh mengakibatkan kesilapan dalam proses pengukuran, dan kebolehpercayaan data boleh dipersoalkan, terutamanya apabila proses pembekuan dan penyahhidratan akan mengubah kandungan air dalam tisu otak (Yaskin, 1984).

Hubungan antara saiz otak dan kerumitan kelakuan telah menimbulkan beberapa persoalan. Walaupun manusia secara umumnya mempunyai kelakuan yang lebih kompleks daripada mamalia lain seperti gajah dan ikan paus, tetapi otak gajah dan ikan

paus adalah 4 hingga 5 kali saiz otak manusia. Walau bagaimanapun, jika nisbah saiz otak haiwan dengan saiz badan diambil kira, maka haiwan dengan permukaan badan yang lebih besar pastinya memerlukan kawasan deria yang lebih besar di dalam otak (Dubuc, 2002).

Dalam kajian ini, bilangan neuron piramid di kawasan lapisan CA1, CA3a dan CA3c/hilus kumpulan yang diberi Madu Tualang menunjukkan perbezaan yang signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan. Ini disokong oleh kajian kelakuan yang menunjukkan kumpulan rawatan kurang melakukan kesilapan berbanding dengan kumpulan kawalan. Ini menunjukkan Madu Tualang memberikan kesan yang positif terhadap prestasi memori tikus dan juga morfologi hipokampus tikus. Kajian lepas menunjukkan kesan positif ini mungkin disebabkan oleh ciri antioksidan madu.

6.2 Limitasi dan Saranan

Tikus yang berumur lapan bulan digunakan dalam kajian ini masih belum dewasa dengan sepenuhnya, dan dianggap muda. Oleh itu, kajian yang dijalankan pada tikus yang matang atau pun tua dan menggunakan tempoh masa yang sama mungkin dapat menjelaskan sama ada diet mempunyai kesan yang sama terhadap tikus yang matang atau pun tua. Ini juga akan memberikan maklumat tentang kesan madu ke atas penuaan normal serta yang melibatkan kemerosotan tisu saraf.

Tikus kebiasaannya adalah nokturnal, iaitu aktif mencari makan pada waktu malam. Ia juga lebih cenderung bergerak dalam kawasan yang tertutup dan tersorok. Kehadiran manusia mungkin mengakibatkan tikus takut untuk bergerak mencari makanan. Ujian kelakuan RAM dijalankan di rumah haiwan di mana pengkaji turut berada di dalam bilik tersebut tetapi di posisi yang sama. Oleh itu, ujian di dalam bilik

tertutup tanpa langsung kehadiran pengkaji serta bantuan video kamera mungkin menghasilkan pemerhatian yang lebih baik.

Kemasukan tikus ke dalam lengan yang tidak pernah diletakkan makanan menjadi kesilapan memori rujukan, manakala kemasukan semula ke dalam lengan yang telah dimasuki sebelum ini merupakan kesilapan memori kerja. RAM dipusingkan pada 45° pada akhir setiap hari (antara ujian berikutnya) dalam beberapa kajian lepas. Ini bertujuan mengelakkan haiwan daripada menggunakan isyarat dalam *maze*, serta memisahkan isyarat *intra-maze* dan *extra-maze*. Prosedur ini menghalang tikus daripada mengikuti jejak olfaktori dan memaksa mereka untuk menggunakan isyarat *extramaze* sahaja (Crusio & Schwegler, 2005). RAM yang digunakan dalam kajian ini mempunyai ciri asas sahaja, iaitu mempunyai lapan lengan yang berdinding. Bagi mengelakkan tikus menggunakan isyarat *intra-maze* seperti isyarat olfaktori, RAM dilap dengan 70% setiap kali tikus berlainan digunakan.

Pengkaji merasakan kaedah suap-paksa madu menggunakan jarum khas adalah kurang sesuai. Ini kerana madu adalah cecair yang likat dan amat sukar diberi secara suap paksa kepada tikus. Walaupun pengkaji telah mencampurkan madu dengan salin, tetapi suap-paksa masih sukar dilakukan. Ini menyebabkan aktiviti memberi madu sedikit demi sedikit dan berhati-hati mengambil masa yang lama dan tikus berasa tidak selesa dan meronta untuk melepaskan diri. Berkemungkinan tikus mengalami kecederaan pada sistem penghadaman dan tekanan dengan keadaan sebegini untuk jangka masa yang lama yang boleh menyebabkan kematian.

Cara pemberian madu kepada tikus juga adalah penting. Ini kerana madu tidak seperti larutan lain yang mudah diberikan secara suap-paksa. Madu boleh diberikan dengan mencampurkan madu dengan makanan tikus. Contohnya, Chepulis et al., (2009) dalam kajiannya menggunakan diet 10% madu dalam bentuk serbuk. Dengan cara ini madu dapat diberikan dengan lebih mudah dan dapat mengelakkan risiko kematian tikus akibat aktiviti suap-paksa.

Selain teknik pewarnaan *Nissl* dan pemerhatian menggunakan mikroskop cahaya, teknik imunohistokimia juga boleh dilakukan. Teknik pewarnaan imunohistokimia (*immunohistochemistry*, IHC) dengan penggunaan mikroskop berpendaflor dan mikroskop elektron berkemungkinan menghasilkan dapatan yang lebih terperinci (Ramos-Vara, 2005). Penggunaan mikroskop elektron membolehkan pengesanan protein tertentu dalam bahagian tisu yang sangat nipis.

Bagi tujuan pengiraan sel, teknik stereologi boleh digunakan. Teknik stereologi membolehkan pengimejan kuantitatif, tiga dimensi (3D) struktur biologi daripada imej dua dimensi (2D) tisu yang dilihat di bawah mikroskop. Contohnya, teknik ini membolehkan anggaran saiz organel tertentu, bilangan neuron atau sinaps di kawasan tertentu di dalam otak dengan tepat (West, 2012a). Teknik stereologi berkemungkinan memberikan pengiraan yang tepat untuk menghasilkan penerangan yang lebih baik tentang hubungan antara struktur dan fungsi. Teknik ini menggambarkan kepentingan morfologi kuantitatif sebagai satu komponen penting daripada penilaian tisu biologi (West, 2012b).

Mekanisme madu dalam meningkatkan memori boleh juga dikaji dengan lebih baik jika kajian lanjutan pada tahap sel dilakukan, contohnya melibatkan kultur sel. Dapat dilihat kesan madu ditahap sitoskeleton sel.

6.3 Kesimpulan

Berdasarkan kajian yang dilakukan bagi melihat kesan madu terhadap memori dari perspektif sains dan tradisi Islam, ketiga-tiga objektif kajian telah dapat dicapai menggunakan kaedah kandungan analisis dokumen dan kaedah eksperimental menggunakan madu tempatan terpilih, iaitu Madu Tualang.

Penggunaan madu secara tradisinya digunakan untuk penjagaan kesihatan. Namun, penggunaan madu untuk meningkatkan memori tidak banyak dibincangkan dari perspektif sains dan tradisi Islam. Penggunaan madu untuk meningkatkan memori amat digalakkan dalam tradisi Islam seperti yang disarankan oleh para sarjana Islam seperti Ibnu Qayyim al-Jauziyyah dan al-Kindi yang menggunakan madu sebagai satu ramuan untuk menguatkan memori. Ini disokong oleh kajian saintifik yang menunjukkan pengambilan madu memberikan kesan yang positif terhadap memori (Bab 5). [Objektif 1]

Penggunaan Madu Tualang didapati memberikan kesan yang positif kepada memori spatial tikus jantan *Sprague Dawley* dewasa. Secara umumnya kumpulan tikus yang diberi Madu Tualang kurang melakukan kesilapan yang melibatkan memori rujukan dan memori kerja berbanding dengan kumpulan kawalan yang diberi salin. Tikus yang diberi Madu Tualang menunjukkan perbezaan yang signifikan pada dua fasa terakhir (minggu 7-12) berbanding dengan kumpulan kawalan. Dapatan kajian ini

mencadangkan bahawa Madu Tualang meningkatkan pembelajaran dan/atau memori selepas enam minggu penggunaannya pada keadaan yang normal. Kesan yang positif ini kekal sehingga minggu ke 12 (Bab 5). [Objektif 2]

Kajian ini menunjukkan bahawa pengambilan madu tidak memberi kesan signifikan terhadap struktur morfologi luaran otak pada kedua-dua kumpulan; walaupun terdapat kecenderungan peningkatan lebar dan panjang otak. Bahagian yang diukur untuk kelebaran otak adalah bahagian otak serebrum di mana hipokampus ditemui di bawahnya (Bab 5). Namun, pengambilan Madu Tualang memberi kesan positif yang signifikan terhadap neuron piramid di kawasan lapisan CA1, CA3a, dan CA3c/hilus hipokampus. Bilangan sel kumpulan yang diberi Madu Tualang menunjukkan perbezaan yang signifikan berbanding dengan kumpulan kawalan. Tiada perbezaan lain dapat diamati pada struktur lapisan sel hipokampus kedua-dua kumpulan. Kawasan lapisan CA1 mencatat bilangan sel yang paling banyak diikuti dengan neuron dilapisan CA3c dan CA3a bagi kedua-dua kumpulan (Bab 5). Hasil kajian histologi ini disokong oleh ujian kelakuan yang menunjukkan kumpulan yang diberi madu kurang melakukan kesilapan berbanding dengan kumpulan kawalan (Bab 5). Ini menunjukkan Madu Tualang mempunyai kesan yang positif terhadap hipokampus, seterusnya pembelajaran dan memori. Ini mungkin disebabkan oleh kandungan antioksidanya yang tinggi. Memandangkan tidak banyak kajian yang dijalankan tentang kesan madu terhadap memori, diharapkan kajian ini dapat memberi pemahaman yang baru tentang hal ini. Oleh itu, lebih banyak kajian lanjut perlu dijalankan bagi memahami mekanisme yang terlibat. [Objektif 3]

RUJUKAN

- Abdullah al-Rahman al-Darimi al-Samarkandi. (1987). Sunan al-Darimi. Beirut, Lebanon: Dar al-Kutub al-‘Arabi.
- Abu Hayyan, M. Y. (1993). Tafsir al-Bahr al-Muhit. Beirut: Dar Al-Kutub Al-Ilmiyah.
- Ahn, S. M., Kim, Y. R., Kim, H. N., Choi, Y. W., Lee, J. W., Kim, C. M., Baek, J. U., Shin, H. K. & Choi, B. T. (2015). Neuroprotection and spatial memory enhancement of four herbal mixture extract in HT22 hippocampal cells and a mouse model of focal cerebral ischemia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 202.
- Ainul Hafiza A.H. & Yusof, N., Maimon, A. (2005). Potensi madu tempatan Malaysia sebagai agen antibakteria [abstrak]. *Sains Malaysiana*, 34(1), 17-20.
- Ajibola, A., Chamunorwa, J. P. & Erlwanger, K. H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & Metabolism*, 9(61).
- Al-Jabri, A. A. (2005). Honey, milk and antibiotics. *African Journal of Biotechnology*, 4 (13), 1580-1587.
- Aljady, A. M., Mohd Yusoff, K., Jamal, A. M., & Mohd. Yassim, M. Y. (2000). Biochemical study on the efficacy of Malaysian honey on inflicted wounds: an animal model. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*, 13(3), 125-132.
- Aljady, A.M. & Mohd Yusoff, K. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys, *Food Chemistry*, 85, 513–518.
- Almeida, I. M., Barreira, J. C., Oliveira, M. B. & Ferreira, I. C. (2011). Dietary antioxidant supplements: benefits of their combined use. *Food Chem Toxicol*, 49(12), 3232-7.
- Al-Razi, A. A. M. (1990). Al-Tafsir al-Kabir aw Mafatih al-Ghayb. Beirut: Dar Al-Kutub Al-Ilmiyah.
- Badriya Al-Rahbi, Rahimah Zakaria, Zahiruddin Othman, Asma Hassan, Zul Izhar Mohd Ismail & Sangu Muthuraju. (2013). Tualang honey supplement improves memory performance and hippocampal morphology in stressed ovariectomized rats. *Acta Histochemica*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2013.05.004>.

- Ball, D. W. (2007). The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education*, 84(10), 1643-1646.
- Baltrusaityte, V., Venskutonis, P. R. & Ceksteryte, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extract, *Food Chemistry*, 101, 502-504.
- Bear, M. F. & Abraham, W.C. (1996). Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci*, 19, 437-62.
- Beaudet, A. & Rambourg, A. (1983). Tri-dimensional structure of nissl bodies: a stereoscopic study in ventral horn cells of rat spinal cord. *The Anatomical Record*, 207, 539-546.
- Becker, J. T., Walker, J. A., & Olton, D. S. (1980). Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Res*, 200, 307.
- Beckman, K. B, & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 78, 547–581.
- Biegler, R., McGregor, A., Krebs, J. R. & Healy, S. D. (2001). A larger hippocampus is associated with longer-lasting spatial memory. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 98, 6941–6944.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., Albertini, M. C. & Piatti, E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97, 217–222.
- Bliss, T. V. P. & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689.
- Bremner, J. D. (1999). Does stress damage the brain? *Biol Psychiatry*, 45, 797-405.
- Briar, C., Lasserson, D., Gabriel, C. & Sharrack, B. (2003). Crash course: nervous system. London: Elsevier Science Ltd.

- Burgess, N., Maguire, E. A. & O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, 35, 625–641.
- Bustos, G., Basoalto, E. & Pinto-Hamuy, T. (2003). Spatial memory in long evans and rattus norvegicus rats. *Journal of biological research*, (36) 2.
- Canal, C. E., Stutz, S. J., & Gold, P. E. (2005). Glucose injections into the dorsal hippocampus or dorsolateral striatum of rats prior to T-maze training: Modulation of learning rates and strategy selection. *Learn, Mem*, 12, 367-374.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W. C., Phillips, K. M., Jacobs, D. R. & Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9, 3.
- Chai, X. J. & Jacobs, L. F. (2009). Sex differences in directional cue use in a virtual landscape. *Behavioral Neuroscience*, 123(2), 276 –283.
- Chauhan, S. S., Pannu, D. S. & Forsmark, C. E. (2012). Carol Rees Parrish (Ed). Antioxidants as adjunctive therapy for pain in chronic pancreatitis. *Practical Gastroenterology*, 49.
- Che Ghazali, F. (2009). Morphological characterization study of Malaysian honey -a vpsem, edx randomised attempt. *Annals of Microscopy* 9, 93-102.
- Chepulic, L. M., Starkey, N. J., Waas J. R. & Molan, P. C. (2009). The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats. *Journal of Physiology & Behavior*, 97, 359–368.
- Cheung, T. H. C. & Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience*, 6, 36.
- Cho, J., Kang, J. S., Long, P. H., Jing, J., Back, Y. & Chung, K. S. (2003). Antioxidant and memory enhancing effects of purple sweet potato anthocyanin and cordyceps mushroom extract. 26(10), 821-825.
- Conrad, C. D. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34(5), 742-55.

- Crusio, W. E. & Schwegler, H. (2005). Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behavioral and Brain Functions*, 1:3.
- Dabbs, J. M, Chang, E. L., Strong, R. A. & Milun, R. (1998). Spatial ability, navigation strategy, and geographic knowledge among men and women. *Evol. Hum. Behav*, 19, 89–98.
- Dalley, R. A., Ng, L. L. & Guillozet-Bongaarts, A. L. (t.t.). Dentate gyrus (DG). Annotation report. Diambil dari <http://community.brain-map.org/download/attachments/798/DG.pdf?version=1>.
- Deuraseh, N. (2006). Health and medicine in the Islamic tradition based on the Book of Medicine (Kitab al-Tibb) of Sahih al Bukhari. *JISHIM*, 5, 2-14.
- D'Hooge, R. & de Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev*, 36(1), 60-90.
- Diba, K. (2012). Neural circuits of the hippocampus. Neural circuits and memory lab, University Of Wisconsin At Milwaukee. Diambil dari <http://neuralcircuits.uwm.edu/neural-circuits-of-the-hippocampus/>
- DNA Learning Center. (t.t.a) CA1 and spatial memory. Diambil dari <http://www.dnalc.org/view/1281-CA1-and-Spatial-Memory.html>
- DNA Learning Center. (t.t.b) Hippocampus and memory. Diambil dari <http://www.dnalc.org/view/1202-Hippocampus-and-Memory-1-.html>
- Doner, L. W. (1976). The sugars of honey-a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443-456.
- Donohoe, R. T. & Benton, D. (1999). Cognitive functioning is susceptible to the level of blood glucose. *Psychopharmacology (Berl)*, 145, 378-85.
- Dubuc, B. (2002). The Brain From Top To Bottom: The Evolutionary Layers of the human brain. Diambil dari http://thebrain.mcgill.ca/flash/i/i_05/i_05_cr/i_05_cr_her/i_05_cr_her.html
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., & Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, 23, 209–226.

- El Falougy, H. & Benuska, J. (2006). History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratisl Lek Listy*, 107(4), 103-6.
- El Falougy, H., Kubikova, E. & Benuska, J. (2008). The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratisl Lek Listy*, 109(3), 106-110.
- Endo, Y., Mizuno, T., Fujita, K., Funabashi, T. & Kimura, F. (1994). Soft-diet feeding during development enhances later learning abilities in female rats. *Physiol Behav*, 56(4), 629-33.
- Epting, L. K., & Overman, W. H. (1998). Sex-sensitive tasks in men and women: A search for performance fluctuations across the menstrual cycle. *Behavioral Neuroscience*, 112, 1304–1317.
- Erejuwa, O. O., Siti A. Sulaiman & Mohd S. Ab Wahab. (2012). Honey - a novel antidiabetic agent. *International Journal of Biological Sciences*, 8(6), 913-934.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A. & Ab Wahab, M. S. (2012). Honey: a novel antioxidant, *Molecules*, 17, 4400-4423.
- Farahmandfara, M., Naghdib, N., Karimiana, S. M., Kadivarc, M. & Zarrindast, M. R. (2012). Amnesia induced by morphine in spatial memory retrieval inhibited in morphine-sensitized rats. *European Journal of Pharmacology*, 683(1–3), 132–139.
- Fenoglio, K. A., Brunson, K. L. & Baram, T. Z. (2006). Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Front Neuroendocrinol*, 27(2), 180-92.
- Ferreira, I., Aires, E., Barreira, J., Estevinho, L. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey sample: different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem*, 114, 1438-1443.
- Forster, M. J., Dubey, A., Dawson, K. M., Stutts, W. A., Lal, H. & Sohal, R. S. (1996). Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 4765–4769.
- Foster, J. K., Lidder, P. G., Sunram, S. I. (1998). Glucose and memory: fractionation of enhancement effects? *Psychopharmacology (Berl)*, 137, 259-70.

- Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. (2001). Color textbook of histology 2nd ed. Pennsylvania: Saunders.
- Ghalamghash, R., Mammadov, Z. H., Ashayery, H., Hosseini, A., Tabibi, H. & Madahi, M. (2012). Effects of handling-injection stress with noise stress on learning and memory in the early life of male rats. *J. Basic. Appl. Sci. Res.*, 2(5), 5065-5069.
- Gheldof, N., Wang, X. & Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5870-5877.
- Gilberto F. Xavier, Francisco J. B. Oliveira-Filho & André'a M.G. Santos. (1999). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus*, 9, 668–681.
- Glisky, E. L. (2007). Brain aging: models, methods and mechanisms. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Good, M. (2002). Spatial memory and hippocampal function: where are we now? *Psicológica*, 23, 109-138.
- Gordon, W. C. (1989). Learning and memory. California: Brooks/Cole Publishing Company.
- Grodstein, F., Chen, J. & Willett, W. C. (2003). High-dose antioxidant supplements and cognitive function in community-dwelling elderly women. *Am J Clin Nutr*, 77(4), 975-84.
- Gu, H., Long, D., Song, C. & Li, Xiao. (2009). Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain cholinergic neurons and improve memory impairments of spatial learning in the rat model of Alzheimer's disease with fimbria-fornix lesion. *Neuroscience Letters*, 453, 204–209.
- Hanson, A. (t.t.). Rat behavior and biology: rats and mazes. Diambil pada 7 Januari 2014 dari <http://www.ratbehavior.org/RatsAndMazes.htm>
- Hashem, H. E., Elmasry, S. M. & Elad, M. A. (2010). Dentate gyrus in aged male albino rats (Histological and TauImmunohistochemical Study). *Egypt. J. Histol*, 33, 659 – 670.

- Hawwa, S. (1999). *al-Asas fi al-Tafsir*, c. 5. Kaherah: Dar al-Salam
- Healy, S. D. & Jozet-Alves, C. (2010). Spatial memory, *Encyclopedia of Animal Behavior*, 304–307.
- Healy, S. D. & Rowe, C. (2007). A critique of comparative studies of brain size. *Proc. R. Soc. B*, 274, 453–464.
- Healy, S. D., de Kort, S. R., & Clayton, N. S. (2005). The hippocampus, spatial memory and food hoarding: a puzzle revisited. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 20(1).
- Hetherington, P., Austin, K., & Shapiro, M. (1994). Ipsilateral associational pathway in the dentate gyrus: An excitatory feedback system that supports n-methyl-d-aspartate-dependent long-term potentiation. *Hippocampus*, 4, 422-438.
- Hunsaker, M. R., Rosenberg, J. S. & Kesner, R. P. (2008). The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, 18(10), 1064–1073.
- Hussein, S. Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S. & Mohd Yusof, Y. A. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of Malaysian honey. *Molecules*, 16, 6378-6395.
- Ibn Hajar al- 'Asqalani. (1989). *Fath al- bari fi sharh Sahih Bukhari*, Beirut: Dar al-Kutub al- 'ilmiyyah.
- Ibn Sina. (1999). *Qanun fi Tibb*. Beirut, vol. 1: Dar al-Kotob al-Ilmiyah.
- Imam Ibn Al-Qaiyim Al-Jauziyah. (1997). *Tibb Nabawi*. Beirut: Resalah Publishers.
- Imam Ibn Al-Qaiyim Al-Jauziyah. (1999). *Healing with the medicine of the Prophet*, Riyadh: Darussalam.
- Isma'il Kathir al-Qurasyi. (1998). *Tafsir al-Quran al-‘Azim*. Beirut: al-Maktabah al-‘Asriyyah.
- Jabatan Penyelidikan Dan Penilaian Institut Aminuddin Baki. (2012). Metodologi kajian tindakan kualitatif. Diambil dari http://www.mppkpkemaman.files.wordpress.com/2012/04/metodologi_penyelidikankualitatif.pdf

- Jacobs, L. F. (2003). Memory spatial, *Encyclopedia of Neurological Sciences*, 87-90.
- Jacobs, L. F. (2003). The evolution of the cognitive map. *Brain Behav. Evol*, 62(2), 128–39.
- Jacobs, L. F., Gaulin, S.J., Sherry, D. F. & Hoffman, G. E. (1990). Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size. *PNAS*, 87(16), 6349–52.
- Jarvis, M. J. (1993). Does caffeine enhance absolute levels of cognitive performance? *Psychopharmacology*, 110, 45–52.
- Jonasson, Z. (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(8), 811–825.
- Jones, M. (1996). Neuroscience methods, Background. Diambil dari [http://psych.colorado.edu/~dbarth/PDFs/4052/4052 %20Manual%20Chapters/Histology%20I.pdf](http://psych.colorado.edu/~dbarth/PDFs/4052/4052%20Manual%20Chapters/Histology%20I.pdf).
- Jones, M. W. & McHugh, T. J. (2011). Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. *Trends in Neurosciences*, 34(10), 526-535.
- Juraska, J., Henderson, C. & Muller, J. (1984). Differential rearing experience, gender, and radial arm maze performance. *Dev Psychobiol*, 17(3), 209-15.
- Kalat, J. W. (1992). Biological psychology fourth edition. Belmont, California: Wadsworth Publishing Company.
- Kamal Kishore & Manjeet Singh. (2005). Rutin (a bioflavonoid antioxidant) attenuates age-related memory deficits in mice. *Biomedical Research (India)*, 16 (1), 6-10.
- Kanoski, S. E. & Davidson, T. L. (2010). Different patterns of memory impairments accompany short- and longer-term maintenance on a high-energy diet. *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes*, 36, 313-319.
- Kesner, R. P. (2007). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn. Mem*, 14, 771-781.

- Kesse-Guyot, E., Fezeu, L., Jeandel, C., Ferry, M., Andreeva, V., Amieva, H., Hercberg, S. & Galan, P. (2011). French adults' cognitive performance after daily supplementation with antioxidant vitamins and minerals at nutritional doses: a post hoc analysis of the Supplementation in Vitamins and Mineral Antioxidants (SU.VI.MAX) trial. *Am J Clin Nutr*, 94(3), 892-899.
- Kessels, R. P. C., de Haan, E. H. F., Kapelle, L. J., & Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effect of hippocampal lesions. *Brain Res Rev*, 35, 295-303.
- Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., Alam, N., Ramli, N., Mohamed, M., Bai'e, S., & Gan, S. H. (2012). Content and antioxidant properties of processed Tualang Honey (Agromas®) collected from different regions in Malaysia. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 214-219.
- Kim, J. J. & Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 453-462.
- Kishore, R. K., Ahmad Sukari, H., M. S. Nurul Syazana & K. N. S. Sirajudeen. (2011). Tualang has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other sources. *Nutrition Research*, 31, 322-325.
- Klur, S. (2006). Functional lateralization of spatial memory in the rat: experimental approach by gene expression profiling and by reversible inactivation of the dorsal hippocampus in a spatial learning task. (Tesis, University Louis Pasteur Strasbourg). Diambil dari http://scd-theses.u-strasbg.fr/1277/01/KLUR_Sandra_2006.pdf
- Kobayashi, S., Kametani, H., Ugawa, Y. & Osanai, M. (1988). Age differences of response strategy in radial maze performance of Fisher-344 rats. *Physiology & Behavior*, 42(3), 277-280.
- Korol, D. L. & Gold, P. E. (1998). Glucose, memory, and aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67: 764S-71S.
- Langdon, K. D., Granter-Button, S., Harley, C. W., Moody-Corbett, F., Peeling, J. & Corbett, D. (2013). Cognitive rehabilitation reduces cognitive impairment and normalizes hippocampal CA1 architecture in a rat model of vascular dementia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1-8.
- Lee, D. W., Miyasato, L. & Clayton, N. S. (1998). Neurobiological basis of spatial learning in the natural environment: neurogenesis and growth in the avian and mammalian hippocampus. *Neuroreport*, 9, 15-27.

- Lein, E. S., Callaway, E. M., Albright, T. D. & Gage, F. H. (2005). Redefining the boundaries of the hippocampal CA2 subfield in the mouse using gene expression and 3-dimensional reconstruction. *J Comp Neurol*, 485, 1-10.
- Levey, M. (1966). The medical formulary or Aqrabadhin of Al-Kindi-translated with a study of its Materia Medica by Martin Levey. Wisconsin: The University of Wisconsin Press.
- Levin, E. D. (2001). Use of the radial-arm maze to assess learning and memory in rodents. CRC Press LLC.
- Lipp, H. P., Pleskachev, M. G., Gossweiler, H., Ricceri, L., Smirnova, A. A., Garin, N. N., Perepiolkina, O. P., Voronkov, D. N., Kuptsov, P. A. & Dell'Omo, G. (2001). A large outdoor radial maze for comparative studies in birds and mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(1), 83-99.
- Lladó-Pelfort, L., Santana, N., Ghisi, V., Artigas, F. & Celada, P. (2012). 35-HT_{1A} receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons. *Cerebral Cortex*, 22(7), 1487-97.
- M. Yusof, M. A., Enchang, F. K. & Mohd Yusoff, K. (2010). Characterization of major sugars in honey as purity indicator [abstract]. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(1), 31-60.
- Ma'luf, L. (1973). Al-Munjid fi al-Lughah wa al-A'lam. Beirut: Dar al-Masyriq.
- Macpherson, K. & Roberts, W. A. (2010). Spatial memory in dogs (*Canis familiaris*) on a Radial Maze. *Journal of Comparative Psychology*, 124(1), 47-56.
- Maguire, E. A., Gadian, D. G., Johnsrude, I. S., Good, C. D., Ashburner, J., Frackowiak, R.S. & Frith, C. D. (2000). Navigation related structural changes in the hippocampus of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 4398-4403.
- Maguire, E. A., Burgess, N., Donnett, J. G., Frackowiak, R. S, Frith, C. D. & O'Keefe, J. (1998). Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science*, 280, 921-924.
- Martin, S. J. & Clark, R. E. (2007). The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cell. Mol. Life Sci*, 64, 401-431.

- Maula, A., Hana, A. & Irawan, A. (2009). Ensiklopedia kemukjizatan sains dalam al-Quran & Sunnah. Kuala Lumpur: Al-Hidayah Publication. (Terjemahan daripada buku Mausu'ah Al-I'jaz Al-'Ilmi Fi Al-Quran Al-Karim Wa As-Sunnah Al-Muthahharah oleh Yusuf A-Hajj Ahmad).
- Md. Ibrahim Khalil, Mahaneem, M., Sahil Jamalullail, S. M., Alam, N. & Sulaiman, S. A. (2010). Evaluation of radical scavenging activity and colour intensity of nine Malaysian honeys of different origin. *Journal of ApiProduct Science*, 3 (1), 04 – 11.
- Minai, A. A. & Best, P. J. (t.t). Encoding Spatial Context: A Hypothesis on the Function of the Dentate Gyrus-Hilus System. http://www.ece.uc.edu/~aminai/papers/minaibest_ijcnn98.pdf.
- Mishima, N., Higashitani, F., Teraoka, K. & Yoshioka, R. (1986). Sex differences in appetitive learning of mice. *Physiology & Behavior*, 37(2), 263–268.
- Mizuseki, K., Royer, S., Diba, K., & Buzsa'ki, G. (2012). Activity dynamics and behavioral correlates of CA3 and CA1 hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus*. 22(8), 1659–1680.
- Mohamad Khairul Azali Sahak,. (2011). Effects of Nenas honey on spatial memory of male adults rats. (Latihan Ilmiah yang tidak diterbitkan). Universiti Malaya.
- Mohamad, S. (1994). Khasiat madu lebah dalam perubatan: kajian surah *al-Nahl*. (Latihan Ilmiah yang tidak diterbitkan), Fakulti Usuluddin, Akademi Islam, Universiti Malaya, Kuala Lumpur.
- Mohamed, M., Sirajudeen, K. N. S., Swamy, M., Yaacob, N. S. & Sulaiman, S. A. (2010). Studies on the antioxidant properties of Tualang honey of Malaysia. *African Journal Traditional CAM*, 7(1), 59-63.
- Mohd Sabran Md Sani. (2013, Julai 1). Madu penawar penyakit. *Harian Metro*. Diambil dari <http://www.hmetro.com.my/articles/Madupenawarpenyakit/Article>.
- Møller, A. P., Erritzoe, J. & Garamszegi, L. Z. (2005). Covariation between brain size and immunity in birds: implications for brain size evolution. *J. Evol. Biol.*, 18, 223–237.
- Morris, R., Anderson, E., Lynch, G. & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319(6056), 774–6.

- Moscovitch, M., Nadel, L., Winocur, G., Gilboa, A. & Rosenbaum, R. S. (2006). The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*, 12, 179-90.
- Muhammad bin Yusuf bin Isa. (1987). *Jami' al-Syamli fi hadithi Khatim al-Rasul SAW*, Beirut: Dar al-Kutub al-'Ilmiah.
- Muhammad Fu'ad Abdul Baqi. (t.t). *Sunan Ibnu Majah*, Beirut, Lubnan: al-Maktabah al-'Ilmiah.
- Muhammad Haris, A. A., Mat Jais, A. M., Goh, Y. M. & Loh, T. C. (2011). Preliminary study on effects of Haruan (*Channa Striatus*) traditional extract (HTE) on spatial learning and memory in rats (abstract). International Conference on Natural Products.
- Muhammad Ismail al-Bukhari al-Ja'fa. (1993). *Sahih al-Bukhari*. Beirut, Lebanon: Dar Ibnu Katsir.
- Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E. & Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts, *Learn. Mem*, 9, 49-57.
- Murphy, G. G., Rahnama, N. P., & Silva, A. J. (2006). Investigation of age-related cognitive decline using mice as a model system: behavioral correlates. *Journal of Am J Geriatr Psychiatry*, 14(12).
- Muslim al-Ḥajjāj al-Qushayrī an-Naysābūrī. (t.t.). *Sahih Muslim*. Beirut, Lebanon: Dar al-Kutub al-'Arabi.
- Nabilah Ismail. (2010). Kesan pengambilan madu dalam tempoh pendek terhadap memori spatial dan prestasi tikus. (Latihan Ilmiah yang tidak diterbitkan). Universiti Malaya.
- Nadel, L. & Hardt, O. (2011). Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology*, 36(1), 251–273.
- Najib, A. Karim. (2008). *Madu lebah ubat yang turun bersama wahyu*. Selangor: Pustaka Ilmi.

- Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A. & Tonegawa, S. (2004). NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature Reviews*, 5, 361-372.
- National Institute on Aging, Alzheimer's Disease. (t.t.). Unraveling the mystery. Diambil dari <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Publications/Unraveling/Glossary/>.
- O'Keefel, J. & Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Clarendon Press.
- O'Keefe, J., Burgess, N., Donnett, J. G., Jejevy, K. J. & Maguire, E. A. (1998). Place cells, navigational accuracy, and the human hippocampus. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B*, 353, 1333-1340.
- Olton, D. S. & Samuelson, R. J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J. Exp. Psychol.*, 2, 97.
- Olton, D. S. & Werz, M. A. (1978). Hippocampal function and behavior: Spatial discrimination and response inhibition. *Physiol. Behav.*, 20, 597.
- Othman, Z., Shafin, N., Zakaria, R., Hussain, N. H. & Mohammad, W. M. (2011). Improvement in immediate memory after 16 weeks of Tualang honey (Agro Mas) supplement in healthy postmenopausal women. *Menopause*, 18(11), 1219-24.
- Owens, L., Finnegan, Y., Hu, H., Scholey, A. B., Sünram-Lea, S. I. (2010). Glucose effects on long-term memory performance: duration and domain specificity. *Psychopharmacology*, 211, 131-140.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Mavroudis, I., Fotiou, D. & Baloyannis, S. (2012). Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub*, 24(2), 152-8.
- Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2(5), 270–278.
- Parihar, M. S. & Hemnani, T. (2003). Phenolic antioxidants attenuate hippocampal neuronal cell damage against kainic acid induced excitotoxicity. *J Biosci*, 28(1), 121-8.

- Paul, C. M., Magda, G. & Abel, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 203(2), 151-164.
- Pormann, P. E. & Savage-Smith, E. (2007). *Medieval Islamic medicine*. Edinburg: Edinburgh University Press Ltd.
- Ragozzino, M. E., Unick, K. E., Gold, P. E. (1996). Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 4693-8.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42(4), 405–426.
- Rat Hippocampus Atlas. (2011). CA3. Diambil pada 6 Ogos 2014 dari <http://cmbnapprod01.uio.no/zoomgen/hippocampus/Structures/CA3.do>
- Restak, R. M. (1984). *The Brain*. America: Bantam Book.
- Riby, L. M., Marriott, A., Bullock, R., Hancock, J., Smallwood, J. & McLaughlin, J. (2009). The effects of glucose ingestion and glucose regulation on memory performance in older adults with mild cognitive impairment. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 566–571.
- Roberts, W. A., Feeney, M. C., MacPherson, K., Petter, M, McMillan, N. & Musolino, E. (2008). Episodic-like memory in rats: is it based on when or how long ago? *Science*, 320(5872), 113-115.
- Rodriguez, D. (2009), Get a memory boost from food, diakses pada 13 Julai 2010, dari <http://www.everydayhealth.com/healthy-living/food-and-your-memory.aspx>
- Ropiredy, D., Scorcioni, R., Lasher, B., Buzsáki, G. & Ascoli, G. A. (2011). Axonal morphometry of hippocampal pyramidal neurons semi-automatically reconstructed after in vivo labeling in different CA3 locations. *Brain Struct Funct*, 216, 1–15.
- Royer, S., Sirota, A., Patel, J. & Buzsaki, G. (2010). Distinct representations and theta dynamics in dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci*, 30, 1777–1787.

- Rozaini, M. Z., Zuki, A. B. Z., Noordin, M., Y. Norimah & Nazrul Hakim, A. (2004). The effects of different types of honey on tensile strength evaluation of burn wound tissue healing. *Intern J Appl Res Vet Med*, 2(4).
- Saleem, S., Haider, S., Madiha, S., Siddiqui, S., Mansoori, S. & Haleem, D. J. (2012). Enhanced memory function in young rats following ascorbic acid administration. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol*, 45(2), 94-98.
- Salganik, R. I. (2001). The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(5), 464S-472S.
- Sandstrom, N. J., Kaufman, J. & Huettel, S. A. (1998). Males and females use different distal cues in a virtual environment navigation task. *Cogn. Brain Res*, 6, 351-360.
- Sarfarz Ahmed & Nor Hayati Othman. (2013). Review of the medicinal effects of Tualang honey and a comparison with Manuka Honey. *Malays J Med Sci*. 20(3), 6-13.
- Saucier, D. M., Green, S. M., Leason, J., MacFadden, A., Bell, S. & Elias, L. J. (2002). Are sex differences in navigation caused by sexually dimorphic strategies or by differences in the ability to use the strategies?. *Behav. Neurosci*, 116, 403-410.
- Scharfman, H. E. & Myers, C. E. (2013). Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 106.
- Scharfman, H. E. (1991). Dentate hilar cells with dendrites in the molecular layer have lower thresholds for synaptic activation by perforant path than granule cells. *The Journal of Neuroscience*, 11(6), 1660-1673.
- Scorza, C. A., Araujo, B. H. S., Arida, R. M., Scorza, F. A., Torres, L. B., Amorim, H. A. & Cavaleiro, E. A. (2010). Distinctive hippocampal CA2 subfield of the amazon rodent proechimys. *Neuroscience*, 169, 965-973.
- Seymour, P., Dou, H. & Juraska, J. (1996). Sex differences in radial arm maze performance: influence of rearing environment and room cues. *Psychobiology*, 24(1), 33-37.
- Shamsuddin Muhammad Ahmad al-Khatib. (1994). Ma'na al-Muhtaj ila Ma'rifah Alfaz al-Minhaj. Beirut, Lebanon: Dar Kutub.

- Shinomiya, K., Tokunaga, S., Shigemoto, Y. & Kamie, C. (2005). Effect of seed coat extract from black soybeans on radial maze performance in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32, 757-760.
- Shukitt-Hale, B., McEwen, J. J., Szprengiel, A. & Joseph, J. A. (2004). Effect of age on the radial arm water maze—a test of spatial learning and memory. *Neurobiol Aging*, 25(2), 223-9.
- Spencer, C. & Weetman, M. (1981). The microgenesis of cognitive maps—a longitudinal-study of new residents of an urban area. *Trans. Inst. Br. Geogr*, 6, 375–384.
- Spencer, K. A., Buchanan, K. L., Leitner, S., Goldsmith, A. R. & Catchpole, C. K. (2005). Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. *Proc. R.Soc. B*, 272, 2037–2043.
- Spieker, E. A., Astur, R. S., West, J. T, Griego, J. A. & Rowland, L. M. (2012). Spatial memory deficits in a virtual reality eight-arm radial maze in schizophrenia. *Schizophr Res*, 135(1-3), 84-9.
- Stephens J. M. C. (2006). The factors responsible for the varying levels of UMF® in mānuka (*Leptospermum scoparium*) honey. (Tesis, University of Waikato). Diambil dari <http://researchcommons.waikato.ac.nz/bitstream/handle/10289/2655/thesis.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Subrahmanyam, M. (2007). Topical application of honey for burn wound treatment—an overview. *Ann. Burns Fire Disasters*, 20, 3.
- Sundaramahalingam, M., Ramasundaram, S., Rathinasamy, S. D., Natarajan, R. P. & Somasundaram, T. (2013). Role of *Acorus calamus* and α -asarone on hippocampal dependent memory in noise stress exposed rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16, 770-778.
- Susuki, S., Augerinos, G. & Black, A.H. (1980). Stimulus control of spatial behavior on the eight-arm maze in rats. *Learn Motiv*, 11, 1-18.
- Sutherland, R. J. (2010). Spatial memory: a rosetta stone for rat and human hippocampal discourse: theoretical comment on Goodrich-Hunsaker and Hopkins. *Behavioral Neuroscience*, 124(3), 434-436.
- Suzuki, W. A. & Clayton, N. S. (2000). The hippocampus and memory: a comparative and ethological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 768–773.

- Syawkani, Muhammad b. 'Ali b. Muhammad al-. (1994). Fath al-Qadir. Beirut: Dar al-Kutub al-'Ilmiyyah.
- Syazana, N. S., Hashida, N. H. Majid, A. M., Durriyah Sharifah, H. A. & Kamaruddin, M. Y. (2011). Effects of Gelam Honey on sperm quality and testis of rat. *Sains Malaysiana*, 40 (11).
- Szilágyi, T., Orbán-Kis, K., Horváth, E., Metz, J., Pap, Z., & Pávai, Z. (2011). Morphological identification of neuron types in the rat hippocampus. *Rom J Morphol Embryol*, 52(1), 15–20.
- Tan, H. T., A Rahman, R., Gan, S. H., Halim, A. S., Hassan, S. A., Sulaiman, S. A., dan Kirnpal-Kaur, B. S. (2009). The antibacterial properties of Malaysian Tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to Manuka honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 34.
- Tan, M. K. (2013). Selected Malaysian honey and its efficacy towards excisional wound healing. (Disertasi yang tidak diterbitkan). Universiti Malaya, Kuala Lumpur.
- Tan, M. K., Hasan Adli, D. S., Tumiran, M. A., Abdulla, M. A. & Mohd Yusoff, K. (2012). The Efficacy of Gelam honey dressing towards excisional wound healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2012/805932.
- Tashiro, A., Makino, H. & Gage, F. H. (2007) Experience specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: A critical period during an immature stage. *J.Neurosci*, 27(12), 3252-3259.
- The Franklin Institute. (2014) .The free radical – an oxidant waiting to happen. Diambil dari <http://www.fi.edu/learn/brain/micro.html#freeradical>.
- The Strowbridgen Lab. (2013). The hippocampus. Diambil pada 5 Julai 2013 dari <http://neurowww.cwru.edu/faculty/strowbridge/Hippocampus/Hippo1.htm>
- Tracy, A. L., Jarrard, L. E. & Davidson, T. L. (2001). The hippocampus and motivation revisited: appetite and activity. *Behav Brain Res*, 14; 127(1-2), 13-23.
- Ullman, M. (1997). Islamic medicine. Edinburgh University Press.
- Universitas Islam Indonesia. (1995). al-Quran dan tafsirnya, PT. Yogyakarta: Dana Bhakti Wakaf.

- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. & Mahajan, R. T. (2009). oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuroparmacol*, 7(1), 65–74.
- Van Haaren, F., Wouters, M. & Van de Poll, N. (1987). Absence of behavioral differences between male and female rats in different radial arm maze procedures. *Physiol Behav*, 39(3), 409–412.
- Wenk, G. L. (2004). Assessment of spatial memory using the radial arm and Morris Water Mazes, *Current Protocols in Neuroscience*, John Wiley & Sons, Inc., 8.5A.1-8.5A.12.
- West, M. J. (1990). Stereological studies of the hippocampus: a comparison of the hippocampal subdivisions of diverse species including hedgehogs, laboratory rodents, wild mice and men. *Prog. Brain Res*, 83, 13–36.
- West, M. J. (2012a). Basic stereology for biologists and neuroscientists. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- West, M. J. (2012b). Introduction to stereology. Cold Spring Harb Protoc. doi: 10.1101/pdb.top070623.
- Williams, C. L., Barnett, A. M., & Meck, W. H. (1990). Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behavioral Neuroscience*, 104, 84 –97.
- Wong, R. K. S. & Traub, R. D. (1983). Synchronized burst discharge in disinhibited hippocampal slice. I. Initiation in CA2-CA2 region. *J Neurophysiol*, 49, 442-457.
- Xavier, G. F., Oliveira-Filho, F .J. & Santos, A. M. (1999). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues?. *Hippocampus*, 9(6), 668-81.
- Yaskin, V. A. (1984). Seasonal changes in brain morphology in small mammals. In *Winter ecology of small mammals* (ed. J. F. Merritt), Pittsburgh, PA: Carnegie Museum of Natural History.
- Young, B. (2006). Wheater's functional histology: a text and colour atlas. Churchill Livingstone: Elsevier.

Zangeneh, F. Z., L. Moezi, & Zargar, A. A. (2009). The effect of palm date, fig and olive fruits regimen on weight, pain threshold and memory in mice. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 25(2).

Zulkifli Mohd Yusoff, Abdul Rashid Ahmad, Fauzi Deraman, Ishak Suliaman, Mustaffa Abdullah, Faisal Ahmad Shah, Mohd Asmadi Yakob, Munirah Abd Razak & Anwar Ridhwan Zakaria. (2011). Kamus al-Quran rujukan lengkap kosa kata dalam al-Quran. Selangor: PTS Islamika Sdn. Bhd.

SENARAI PENERBITAN DAN KERTAS KERJA YANG DIBENTANGKAN

PEMBENTANGAN KERTAS PENYELIDIKAN

No	Jenis pembentangan/ Tajuk	Anjuran	Seminar	Tarikh
1	Poster Diversity of Central Nervous System of Local Birds: A Preliminary Study	UM	University of Malaya Innovation and Creativity Expo	1-3 April 2010
2	Oral Saranan penggunaan madu oleh Al-Quran dan aplikasinya dalam kajian sains kesihatan.	Center of Quranic Research, UM	The Annual International Quranic Conference	11-12 Januari 2011
3	Oral The Islamic and Science Perspective on The Positive Effects of Honey on Cognitive Functions	Universiti Sains Malaysia	International Conference on Traditional Medicine	29-30 November 2011
4	Poster Madu untuk Pengukuhan Memori: Perspektif Islam dan Sains	Center of Quranic Research, UM	The International Seminar in Islamic Studies II	15-16 Februari 2012
5	Poster Effects of Tualang Honey Intake on Spatial Memory of Adult Rat	Universiti Malaysia Sabah	International Neuroscience Symposium 2012	23-25 Julai 2012
6	Oral Saranan Penggunaan Madu Oleh Al-Quran dan Sokongan Saintifik Mengenai Khasiatnya Untuk Memori	Unisza	International Seminar on Al-Quran in Contemporary Society (SQ2012)	1-2 Disember 2012
7	Poster Histological analysis of pyramidal neuron in rat's hippocampus after Tualang honey intake	Monash University Sunway Campus	4th International NeuroMalaysia Symposium	28 September 2013
8	Poster (Tempat kedua bagi Poster Terbaik) Tualang Honey Consumption Improves Spatialmemory Performance and Hippocampal Pyramidal Neurons Cell Count in Adult Male Rat	Universiti Hasanuddin, Makassar, Indonesia.	3 rd International Conference on the Medicinal Use of Honeybee Products	20-22 November 2013

SENARAI PENERBITAN

Jurnal

1. **Mohd Amiruddin Kamarulzaidi**, M.Y. Zulkifli Mohd. Yusoff & Durriyyah Sharifah Hasan Adli. (2014). Quranic advocacy of honey consumption and its application towards memory enhancement. *International Journal on Quranic Research*, 6(1): 17-32.
2. **Mohd Amiruddin Kamarulzaidi**, M. Y. Zulkifli Mohd. Yusoff, Abdul Majid Mohamed & Durriyyah Sharifah Hasan Adli. (2015). Tualang Honey Consumption Enhanced Hippocampal Pyramidal Count and Spatial Memory Performance of Adult Male Rats. *Sains Malaysiana*. (In press)

Prosiding

1. **Mohd Amiruddin Kamarulzaidi**, MY Zulkifli Mohd. Yusoff, Nabilah Ismail, Nor Syazana Sufian, Tan Mui Koon, Kamaruddin Mohd Yusoff, Noor Hashida Hashim & Durriyyah Sharifah Hasan Adli. (2011). Saranan penggunaan madu oleh Al-Quran dan aplikasinya dalam kajian sains kesihatan. *The Annual International Quranic Conference*. (11-12 January 2011). Hlm. 69
2. Bibi Shaswani Zulbadri, Nurul Wahida Che Mat Zuki, Mohd Amzari Tumiran, **Mohd Amiruddin Kamarulzaidi**, Mohd Noor Musa, Noor Naemah Abd. Rahman, MY Zulkifli Mohd Yusoff, Rohaida Mohd Saat, Rosli Ramli & Durriyyah Sharifah Hasan Adli. (2011). Kelakuan Burung: Analisis Perbandingan dari Perspektif Rujukan Berteraskan al-Qur'an dan Neurosains. *The Annual International Quranic Conference*. (11-12 January 2011). Hlm. 66
3. **Mohd Amiruddin Kamarulzaidi**, M. Y. Zulkifli Mohd. Yusoff, Mohamad Khairul Azali Sahak & Durriyyah Sharifah Hasan Adli. (2011). The Islamic and Science Perspective on The Positive Effects of Honey on Cognitive Functions. *International Conference on Traditional Medicine*. (29-30 November 2011). Hlm. 385-397

QURANIC ADVOCATION OF HONEY CONSUMPTION AND ITS APPLICATION TOWARDS MEMORY ENHANCEMENT¹

Mohd Amiruddin Kamarulzaidi¹, M.Y. Zulkifli Mohd. Yusoff²

& Durriyyah Sharifah Hasan Adli³

ABSTRACT

Over the years honey is not only considered as a natural sweetener, but it is also regarded as a healthy food. Honey meets the requirements as *halal* (lawful) and *tayyiban* (good), as mentioned in the Quran. However, very few studies have focused on the effect of honey on memory, either from a scientific perspective or Islamic tradition. This paper looking at the benefits of honey on the memory. The information presented in this paper will look at the benefits of honey on facilitating memory which is made available through a content analysis of scientific references and traditions of Islam. In addition to scientific research reports laboratory studies from the group also become part of the resources for the scientific perspective on honey consumption for this purpose. The Quran, *hadith* and Islamic scholars writings made up the main source for Islamic perspective on the matter. Honey is highly regarded to the Muslim community as exemplified by the specific mentions in surah *al-Nahl* (chapter on Bees). Verses 68 and 69 of surah *al-Nahl* referred to various colors of honey produced by bees with nests in different places. Also mentioned is about the ability of honey as a remedy for various ailments. There are also *hadith* eluding to related practices using honey by the Prophet as well as recommendations for health problems. Some Islamic scholars, such as al-Zuhri, recommended honey for its good effects on memory. Our laboratory studies proved the benefits of honey on spatial memory (memory with regards to space). A local honey, honey Tualang, was found to have increased spatial memory of rats, especially working memory (short term memory) compared to the reference memory (long term memory). Thus, both the perspectives of Islam and science are in agreement that honey can play a positive role in human health care.

Keywords: *Honey, Memory, Islamic Medicine, Natural Resources, Tualang honey.*

<http://ejum.fsktm.um.edu.my/article/1481.pdf>

EDITOR/AUTHOR CORRESPONDENCE

Section Editor
2015-08-05 03:40 PM

Subject: [Sains Malaysiana] Editor Decision

DELETE

Assoc Prof Dr Durriyyah Sharifah Hasan Adli:

I wish to inform you that the paper entitled:

"Tualang Honey Consumption Enhanced Hippocampal Pyramidal Count and Spatial Memory Performance of Adult Male Rats"

has been accepted for publication in Sains Malaysiana. You will receive the proof prior to publication. Thank you submitting your paper to Sains Malaysiana.

Suzana Shahar
suzana.shahar@gmail.com

Sains Malaysiana
<http://ejournal.ukm.my/jsm>

Penerbitan artikel jurnal ISI (*In press*)

Tualang Honey Consumption Enhanced Hippocampal Pyramidal Count and Spatial Memory Performance of Adult Male Rats

(Pengambilan Madu Tualang Meningkatkan Bilangan Sel Piramid Hipokampus dan Prestasi Memori Spatial Tikus Jantan Dewasa)

MOHD AMIRUDDIN KAMARULZAIDI¹, M. Y. ZULKIFLI MOHD. YUSOFF²,
ABDUL MAJID MOHAMED³ & DURRIYYAH SHARIFAH HASAN ADLI^{4*}

¹*Institute of Graduate Studies, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia.*

²*Al-Qur'an and Hadith Department, Academy of Islamic Studies, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia.*

³*Division of Biology, Center for Foundation Studies in Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia.*

⁴*Division of Biohealth Science, Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia.*

*Corresponding author; email: durriyyah@um.edu.my

ABSTRACT

As a natural anti-oxidant source, Tualang honey, produced by wild bees nesting on the Tualang tree (*Koompassia excelsa*) is expected to have positive influence on health, including memory. This study investigated the effect of Tualang honey on the cell count of memory formation related hippocampal pyramidal neuron and on spatial memory performance (SMP) of rats using the radial arm maze (RAM). *Sprague Dawley* male rats (n=24), 7-8 weeks old were divided into two groups; experimental group group force-fed 1mL/100g body weight with 70% honey (HG), the control group with 0.9% saline (CG) for 12 weeks. Nissl staining technique (with cresyl violet) was employed for neurohistological analysis of the hippocampal tissue. Six randomly selected rats from each group were used for the neuronal soma counting of pyramidal cell layer CA1, CA3a and CA3c regions. Two-way *ANOVA* analysis showed positively significant differences between treatment and control groups for SMP comparison of Working Memory and Reference Memory components, as well as the

Effects of Tualang Honey Intake on Spatial Memory of Adult Rat

Mohd. Amiruddin Kamarulzaidi¹, M.Y. Zulkifli Mohd. Yusoff²,

and Durriyyah Sharifah Hasan Adli³

¹*Institute of Graduate Studies*, ²*Academy of Islamic Studies*, ³*Faculty of Science*,
Universiti Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia.

Corresponding author: mohd_amiruddin@siswa.um.edu.my

Honey intake is traditionally practised for it is widely believed to have varied positive effects on health. Recent studies reported that it is a natural antioxidant source that is good for health. Tualang honey is one of the commonly consumed local honey. This Malaysian honey is produced by wild bees that are nesting on the Tualang trees. The current study aimed to investigate the effects of Tualang honey on spatial memory performance (SMP) through behavioral test and using male adult rats as the experimental animals. Experiment involved 20 *Sprague-Dawley* rats (7-8 weeks old) force-fed daily for 12 weeks with 1ml/100g of body weight of honey (n=8) or 0.9% saline as control (n=12). Radial arm maze (RAM) test was conducted once a week to evaluate SMP of rats, which was distinguished into working and reference memory components of spatial memory. On Day 5 of treatments, rats were trained in RAM and starved on the following day. This would make the rats more motivated to find food (rewards) during the test session conducted on Day 7. During each SMP session, the tested rat was placed in the center of RAM and allowed to explore the whole RAM for 3 minutes to find the food placed in four specific arms. Quantitative analysis of SMP was divided into three phases: Phase 1 (week 1-3), Phase 2 (week 4-6), Phase 3 (week 7-9) and Phase 4 (week 10-12). Results showed that treatment group (honey) exhibited a significant decrease in the total number of errors compared to the control group (saline). Reference and working memory errors were significantly higher in control group. Therefore, this study demonstrated the positive effects of the intake of Tualang honey on spatial memory by the enhancement of reference and working memory components.

**International Neuroscience Symposium 2012, 23-25 Julai 2012, Universiti Malaysia
Sabah**

THE 3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MEDICINAL USE OF HONEYBEE PRODUCTS

Honey: "From Traditional To Modern Medicine"



PROGRAM & ABSTRACT BOOK



**20-22 November 2013
Hasanuddin University,
Makassar, INDONESIA**

INTRODUCTION

- Honey intake is traditionally practiced for its widely believed to have varied positive effects on health. Recent studies also reported that honey improved memory performance & hippocampal morphological impairment, e.g. Tualang honey [1].
- Malaysian Tualang honey is a wild multifloral honey produced by Apis mellifera bees, Apis dorsata. The bees build numerous honeycombs on branches of very tall Tualang trees (Alstonia scholaris) [2].
- Evaluation of the spatial memory involves testing working memory (short term memory) and reference memory (long term memory).
- Hippocampus, a structure involved in learning and memory formation, comprises of CA1 layer, CA2 layer & dentate gyrus [3].
- Based on laminar order of neocortex, these hippocampal pyramidal cell layers can be further divided into a number of subfields: CA1a, CA2 (region between CA1 & CA3), CA3a & CA3 (region between CA3 & CA4), CA4a & CA4 [4].

OBJECTIVE

- This study investigated the effects of Tualang honey on spatial memory performance (SMP) and pyramidal neurons population of the hippocampus.

METHODOLOGY

Experiment involved 20 Sprague-Dawley male rats (2-3 months old, 180-200g body weight) divided into 2 groups: honey (0.5ml, twice daily for 12 weeks) or 0.5ml saline for 12 weeks.

Weekly 8-arm Radial Arm Maze test (RAM).
 (1st, 2nd, 3rd, and 7th arms were baited)

Baited Rats through Intracerebral perfusion of cannulated rats at end of 12 weeks.

Histological processing: H&E staining technique, which employed cresyl violet dye.

Analyze Hippocampal cell count & type using computer software with the aid of Image Analysis Software at 20x magnification.

- Phases of Quantitative Analysis of SMP: Phase 1 (week 1-4), Phase 2 (week 4-6), Phase 3 (week 7-9) and Phase 4 (week 10-12).

Reference Memory Error (RME): the first entry into non-baited arms.

Working Memory Error (WME): the re-entry into baited arms where the food had already been eaten.

Total Error (TE): the number of first entry and re-entries into the non-baited arms.

For each animal, both hemispheres of hippocampus from three different sections were analyzed (Fig. 2).

Cell counting involved three areas of pyramidal cell layer: CA1, CA2 and the dentate hilus/CA3 (Fig. 2/3).

Each neuronal soma considered has a clear nucleus and nucleolus (Fig. 4).



Figure 3: Transverse section of rat hippocampus in both brain hemispheres (H&E)



Figure 2: Pyramidal neurons in 3 different areas: (a) CA1a, (b) CA1, (c) CA2a (H&E)



Figure 4: Pyramidal neurons in 3 different areas: (a) CA1a, (b) CA1, (c) CA2a (H&E)

RESULTS & DISCUSSION

1. Spatial Memory Performance (SMP)

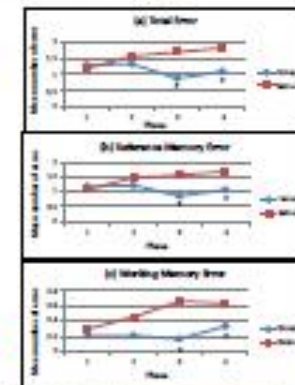


Figure 1: Effects of Tualang honey on the performance of (a) TE, (b) RME and (c) WME. Test 24 compared with the control group (baited).

- Generally, honey treated group exhibited a decrease in TE, RME, and WME as compared to the control group (Fig. 1).
- Honey treated group exhibited a significant decrease in TE (Fig. 1a), RME (Fig. 1b), and WME (Fig. 1c) during the last two phases compared. The findings suggested that honey significantly enhanced learning and/or memory after 7 weeks of its consumption. This effect remained up to 12 weeks of consumption (Fig. 1c).
- Lower number of re-entries into baited arms compared to the first entries into non-baited arms (Fig. 1c) indicated that Tualang honey significantly post the effect to feed Tualang working memory as compared to the reference memory.

2. Neurohistological analysis

Table 1: Hippocampal pyramidal cell count

GROUP	CA1	CA2a	Hilus/CA3a
Honey	86.88 ± 0.004 ^a	87.28 ± 0.004 ^a	82.21 ± 0.004 ^a
Saline	81.11 ± 0.004 ^a	83.88 ± 0.004 ^a	78.78 ± 0.004 ^a

CA1 and CA2a were significant at 0.001 < p < 0.001. CA3a was not significant. Values with different superscript (a, b) within each column (not within each column) were significantly different (p < 0.05) by type of hippocampal pyramidal cell layer.

- The results indicated a significant difference between the number of cells in the treatment group compared to control (Table 1).
- This neurohistological finding supported the behavioral test; honey treated group exhibiting a significant decrease in TE, RME, and WME compared to the control group [6].
- Cell count of CA1 was the most abundant, followed by CA2a and CA3a. CA1 region is important for long-term spatial memory [5] while CA2 region may play a key role in short-term memory of tasks with a duration of seconds and minutes [6].
- This study supported the report that Tualang honey could improve the memory and hippocampal morphological impairment [1]. Possibly these post the effects were due to its high antioxidant properties [1, 7].

CONCLUSIONS

- Tualang honey demonstrated post the effects behaviorally and neurobiologically. This is possibly due to its antioxidant-rich properties.

REFERENCES

- Wahid, W., Anisulhuda, A., Anisulhuda, A., Muzi, Y., Yusoff, M., & Hassan, A. (2013). Tualang honey consumption improves spatial memory performance in hippocampal pyramidal neurons in adult male rats. *Journal of Food Science*, 94(1), 1-10.
- Wahid, W., Anisulhuda, A., Anisulhuda, A., Muzi, Y., Yusoff, M., & Hassan, A. (2013). Tualang honey consumption improves spatial memory performance in hippocampal pyramidal neurons in adult male rats. *Journal of Food Science*, 94(1), 1-10.
- Wahid, W., Anisulhuda, A., Anisulhuda, A., Muzi, Y., Yusoff, M., & Hassan, A. (2013). Tualang honey consumption improves spatial memory performance in hippocampal pyramidal neurons in adult male rats. *Journal of Food Science*, 94(1), 1-10.
- Wahid, W., Anisulhuda, A., Anisulhuda, A., Muzi, Y., Yusoff, M., & Hassan, A. (2013). Tualang honey consumption improves spatial memory performance in hippocampal pyramidal neurons in adult male rats. *Journal of Food Science*, 94(1), 1-10.
- Wahid, W., Anisulhuda, A., Anisulhuda, A., Muzi, Y., Yusoff, M., & Hassan, A. (2013). Tualang honey consumption improves spatial memory performance in hippocampal pyramidal neurons in adult male rats. *Journal of Food Science*, 94(1), 1-10.
- Wahid, W., Anisulhuda, A., Anisulhuda, A., Muzi, Y., Yusoff, M., & Hassan, A. (2013). Tualang honey consumption improves spatial memory performance in hippocampal pyramidal neurons in adult male rats. *Journal of Food Science*, 94(1), 1-10.
- Wahid, W., Anisulhuda, A., Anisulhuda, A., Muzi, Y., Yusoff, M., & Hassan, A. (2013). Tualang honey consumption improves spatial memory performance in hippocampal pyramidal neurons in adult male rats. *Journal of Food Science*, 94(1), 1-10.

ACKNOWLEDGMENT

University of Malaya Research Grant (UMRG) 60321/2013/1/UMRG



4th
**NEUROMALAYSIA
SYMPOSIUM**

28TH SEPTEMBER 2013
MONASH UNIVERSITY SUNWAY

POSTER PRESENTATION

Effect of Tualang honey intake on hippocampal pyramidal neuronal numbers

Mohd Amiruddin Kamarulzaidi¹, M.Y. Zulkifli Mohd. Yusoff², & Durriyyah Sharifah Hasan Adli³ | ¹Institute of Graduate Studies, ²Academy of Islamic Studies, ³Faculty of Science, University of Malaya, Malaysia

It has been reported that honey is a natural antioxidant source. This study investigated the possible effect of the local Tualang honey on pyramidal neuronal numbers in hippocampus, a structure implicated in memory processes. Experiment involved 20 *Sprague-Dawley* male rats (7-8 weeks old), force-fed daily 1ml/100g of body weight with either 70% honey or 0.9% saline solution for 12 weeks. At the end of the treatment period, anesthetized rats were fixed by intracardiac perfusion method with 10% formalin solution. Neurohistological Nissl staining technique, which employed cresyl violet as dye, was used to visualize the pyramidal neurons of the hippocampal tissue. Both hemispheres of each hippocampus were analyzed for the pyramidal neuronal cell counting. Light microscopy cell counting was done manually with the aid of *Life Science Analyzer Software* at 200x magnification. Cell counting of the hippocampal pyramidal cell layer involved specific areas of CA1, CA3 and the dentate hilus; standardized at 358.8x266.34 μ m² each. Visualization of clear nucleus and nucleolus was a prerequisite for each neuronal soma that was considered. Comparison between groups were evaluated using Two-Way ANOVA. Data expressed as means \pm SEM with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Generally, cell counts of CA1 area was the highest followed by hilus and CA3 areas, respectively. The results also indicated significant differences between the cell numbers of the selected specific areas in the treatment group (CA1=64.65 \pm 0.65; CA3=37.24 \pm 0.65; Hilus=52.21 \pm 0.65) compared to control groups (CA1=61.11 \pm 0.65; CA3=33.46 \pm 0.65; Hilus=48.78 \pm 0.65). Hence, this study demonstrated positive effect of Tualang honey on pyramidal neuronal numbers in rat hippocampus. Future studies should consider the potential of Tualang honey having neuroprotective effect, especially since neuronal loss in both CA1 and CA3 areas have been reported in neurodegenerative disorders, like in Alzheimer's Disease.

4th International NeuroMalaysia Symposium, 28 September 2013, Monash University Sunway Campus

LAMPIRAN

Lampiran A

- **PERSEDIAAN BAHAN KIMIA UNTUK PROSES PERFUSI DAN HISTOLOGI**

1. **Salin 0.9%**

Sodium klorida (NaCl)	0.9 g
Air suling	100ml

2. **Formalin 10%**

Formaldehid	100ml
Air suling	900ml

- **LARUTAN UNTUK TEKNIK PEWARNAAN *NISSL***

1. **Buffer pH 3.5**

0.1M acetic acid (6ml/1000ml air suling)	94ml
0.1M sodium acetate (13.6g/1000ml air suling)	6ml

2. **Cresyl violet (hanya boleh digunakan dua kali sahaja)**

Cresyl violet acetate	0.2g
Air suling	150ml

3. ***Working solution***

<i>Buffer solution</i>	100ml
Cresyl violet	10ml

Lampiran B

Protokol Teknik Pewarnaan *Nissl*

Langkah-langkah	Tempoh
<i>Deparaffinization</i>	
1) Xilena (I)	3 minit atau lebih
2 Xilena (II)	3 minit atau lebih
<i>Hidrasi</i>	
1) Alkohol 95% (I)	3 minit atau lebih
2) Alkohol 95% (II)	3 minit atau lebih
3) Celup dengan seloidin	-
4) Alkohol 70%	3 minit atau lebih
5) Air suling (I)	Bilas
6) Air suling (II)	Bilas
<i>Pewarnaan</i>	
1) Cresyl violet	20 minit
2) Alkohol 70%	Bilas
<i>Dihidrasi</i>	
Tertiary Butyl Alcohol – TBA (I)	2 – 3 minit
Tertiary Butyl Alcohol – TBA (II)	2 – 3 minit
Tertiary Butyl Alcohol – TBA (III)	2 – 3 minit
<i>Clearing</i>	
1) Xilena (III)	3 minit
2) Xilena (IV)	3 minit atau lebih
<i>Mount dengan DPX</i>	

Lampiran C

DATA STATISTIK

a) Kesalahan Mutlak

Estimates

Dependent Variable: COMPUTE S_TE=SQRT(TE)

Treatment	Phase	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Honey	Phase1	1.281	.121	1.043	1.519
	Phase2	1.311	.121	1.073	1.549
	Phase3	.878	.121	.640	1.116
	Phase4	1.085	.121	.847	1.323
Saline	Phase1	1.179	.099	.985	1.373
	Phase2	1.551	.099	1.357	1.745
	Phase3	1.674	.099	1.480	1.868
	Phase4	1.802	.099	1.607	1.996

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: COMPUTE S_TE=SQRT(TE)

Phase	(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
						Lower Bound	Upper Bound
Phase1	Honey	Saline	.102	.156	.514	-.205	.409
	Saline	Honey	-.102	.156	.514	-.409	.205
Phase2	Honey	Saline	-.240	.156	.126	-.547	.068
	Saline	Honey	.240	.156	.126	-.068	.547
Phase3	Honey	Saline	-.796*	.156	.000	-1.103	-.489
	Saline	Honey	.796*	.156	.000	.489	1.103
Phase4	Honey	Saline	-.716*	.156	.000	-1.024	-.409
	Saline	Honey	.716*	.156	.000	.409	1.024

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b) Kesalahan Memori Rujukan

Estimates

Dependent Variable: S_RME

Treatment	Phase	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Honey	Phase1	1.186	.108	.974	1.398
	Phase2	1.220	.108	1.008	1.433
	Phase3	.861	.108	.648	1.073
	Phase4	1.072	.108	.860	1.284
Saline	Phase1	1.080	.088	.906	1.253
	Phase2	1.476	.088	1.303	1.650
	Phase3	1.565	.088	1.392	1.738
	Phase4	1.690	.088	1.516	1.863

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: S_RME

Phase	(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
						Lower Bound	Upper Bound
Phase1	Honey	Saline	.106	.139	.447	-.168	.380
	Saline	Honey	-.106	.139	.447	-.380	.168
Phase2	Honey	Saline	-.256	.139	.067	-.530	.018
	Saline	Honey	.256	.139	.067	-.018	.530
Phase3	Honey	Saline	-.704 [*]	.139	.000	-.979	-.430
	Saline	Honey	.704 [*]	.139	.000	.430	.979
Phase4	Honey	Saline	-.618 [*]	.139	.000	-.892	-.344
	Saline	Honey	.618 [*]	.139	.000	.344	.892

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

c) Kesalahan Memori Kerja

Estimates

Dependent Variable: S_WME

Treatment	Phase	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Honey	phase1	.208	.107	-.003	.420
	phase2	.208	.107	-.003	.420
	phase3	.167	.107	-.045	.378
	phase4	.333	.107	.122	.545
Saline	phase1	.296	.088	.124	.468
	phase2	.453	.088	.280	.625
	phase3	.661	.088	.489	.834
	phase4	.631	.088	.458	.803

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: S_WME

Phase	(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
						Lower Bound	Upper Bound
phase1	Honey	Saline	-.088	.138	.527	-.360	.185
	Saline	Honey	.088	.138	.527	-.185	.360
phase2	Honey	Saline	-.244	.138	.079	-.517	.028
	Saline	Honey	.244	.138	.079	-.028	.517
phase3	Honey	Saline	-.495 [*]	.138	.000	-.767	-.222
	Saline	Honey	.495 [*]	.138	.000	.222	.767
phase4	Honey	Saline	-.297 [*]	.138	.033	-.570	-.025
	Saline	Honey	.297 [*]	.138	.033	.025	.570

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

d) Bilangan sel piramid

Estimates

Dependent Variable: number

Cell	Treatment	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
CA1	Honey	64.656	.650	63.380	65.932
	Saline	61.111	.650	59.835	62.387
CA3	Honey	37.244	.650	35.968	38.520
	Saline	33.456	.650	32.180	34.732
Hilus	Honey	52.211	.650	50.935	53.487
	Saline	48.778	.650	47.502	50.054

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: number

Cell	(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
						Lower Bound	Upper Bound
CA1	Honey	Saline	3.544 [*]	.920	.000	1.740	5.349
	Saline	Honey	-3.544 [*]	.920	.000	-5.349	-1.740
CA3	Honey	Saline	3.789 [*]	.920	.000	1.984	5.593
	Saline	Honey	-3.789 [*]	.920	.000	-5.593	-1.984
Hilus	Honey	Saline	3.433 [*]	.920	.000	1.629	5.238
	Saline	Honey	-3.433 [*]	.920	.000	-5.238	-1.629

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

BERAT BADAN TIKUS SEPANJANG EKSPERIMEN

Kumpulan rawatan (Madu Tualang)

No.	Tikus	29/5/11	6/1/2011	6/4/2011	6/7/2011	6/10/2011	13/6/11	16/6/11	19/6/11	22/6/11	25/6/11	28/6/11	7/1/2011	7/4/2011	7/7/2011	7/10/2011	13/7/11	16/7/11	19/7/11	22/7/11	25/7/11	28/7/11	31/7/11	8/3/2011	8/6/2011	8/9/2011	8/12/2011	15/8/11	18/8/11	21/8/11
1	Saline 1C	256	244	263	271	249	272	254	268	248	251	263	281	289	280	283	308	303	316	312	323	341	342	356	367	374	378	379	380	393
2	Saline 1NC	280	271	286	313	287	310	280	298	278	273	299	317	331	322	286	347	352	374	361	380	389	400	393	401	412	410	414	411	413
3	Saline 2C	210	211	214	228	207	223	208	220	214	222	230	245	252	253	254	274	268	275	261	275	271	268	281	288	296	298	300	287	300
4	Saline 2NC	215	221	243	267	245	260	256	280	267	273	283	303	345	313	320	330	316	334	320	342	345	340	364	380	380	388	381	377	382
5	Saline 3C	204	210	226	243	227	242	234	248	234	245	250	260	270	274	278	303	304	324	312	339	343	350	366	381	400	402	409	408	418
6	Saline 3NC	217	220	228	255	223	245	232	242	228	219	254	260	272	268	275	297	290	307	298	320	318	331	342	350	370	371	368	380	387
7	Saline 4C	230	245	268	286	260	271	253	266	257	248	274	294	315	295	300	322	317	332	335	340	350	351	365	356	375	385	390	385	383
8	Saline 4NC	218	216	220	240	216	228	215	232	220	232	240	249	250	261	260	295	292	310	303	316	330	326	338	336	350	358	357	363	365
9	Saline 5C	210	202	211	235	212	235	218	242	230	240	254	270	285	288	295	322	328	350	333	359	375	372	390	401	412	415	417	426	430
10	Saline 5NC	232	221	215	230	211	236	219	246	225	240	248	260	273	268	276	297	300	320	306	320	330	325	332	340	350	348	346	355	360
11	Saline 6C	251	240	232	264	233	261	243	268	253	259	268	282	296	284	296	296	308	325	316	324	344	348	365	348	375	374	385	382	406
12	Saline 6 NC	219	213	223	252	222	248	235	257	245	258	271	268	281	284	285	310	300	304	300	308	336	342	355	345	376	375	380	386	403

Kumpulan kawalan (salin)

No.	Tikus	6/5/2011	6/8/2011	6/11/2011	14/6/11	17/6/11	20/6/11	23/6/11	26/6/11	29/6/11	7/2/2011	7/5/2011	7/8/2011	7/11/2011	14/7/11	17/7/11	20/7/11	23/7/11	26/7/11	29/7/11	8/1/2011	8/4/2011	8/7/2011	8/10/2011	13/8/11	16/8/11	19/8/11	22/8/11	25/8/11
1	Honey 1C	189	203	194	210	217	237	232	241	253	257	265	276	281	294	291	298	298	297	316	318	324	310	317	322	337	327	348	350
2	Honet 2C	214	219	206	216	215	230	227	222	246	244	245	250	253	268	269	276	273	271	282	284	300	284	290	283	297	293	317	314
3	Honey 2NC	203	214	250	205	203	216	214	229	225	230	238	242	250	269	265	282	270	273	294	298	312	296	306	301	325	311	340	336
4	Honey 3C	265	272	260	273	263	291	275	281	305	316	322	335	340	358	345	370	355	356	378	375	380	363	392	372	402	391	429	426
5	Honey 3NC	204	216	196	217	215	226	219	222	235	238	234	244	245	260	258	269	252	252	275	280	288	277	287	281	305	303	330	332
6	Honey 4NC	275	280	262	270	286	295	286	281	303	314	313	323	320	350	343	362	358	356	375	380	386	363	380	366	383	370	410	412
7	Honey 5 C	261	250	245	320	253	270	255	243	268	275	283	289	291	306	300	314	315	310	327	333	339	324	335	331	347	343	364	361
8	Honey 6NC	205	212	199	212	218	224	217	221	241	252	264	275	273	288	283	294	291	296	299	302	306	295	307	303	301	294	308	304